

**VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ –
TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA**

Hornicko-geologická fakulta

Institut Environmentálního Inženýrství

**KVASINKY A JEJICH VYUŽITÍ
V ENVIRONMENTÁLNÍCH BIOTECHNOLOGIÍCH**

bakalářská práce

Autor:

Jana Boturová

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Vladimír Čablík Ph.D.

Ostrava 2010

Zadání bakalářské práce

Student:

Jana Boturová

Studijní program:

B2102 Nerostné suroviny

Studijní obor:

3904R028 Environmentální biotechnologie

Téma:

Kvasinky a jejich využití v environmentálních biotechnologiích

Yeast and their Utilization in the Environmental Biotechnologies

Zásady pro vypracování:

Závěrečná kvalifikační práce bude vypracována v souladu s navrženou osnovou:

1. Úvod a cíl práce
2. Kvasinky, morfologie, cytologie, popis fyziologických a biochemických vlastností
3. Izolace a indentifikace kvasinek
4. Využití kvasinek v environmentálních biotechnologiích
5. Závěrečné shrnutí

Seznam doporučené odborné literatury:

Singh V.P., and Stapleton R.D.Jr (Eds.): Biotransformations: Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection. Progress in Industrial Mikrobiology 36, 2003.

Fialová A.; Čejková A.; Masák J.; Jirků V.: Působení vnějších vlivů na biodegradační a enzymovou aktivitu mikrobiálních populací vůči fenolickým aromátům srovnání kvasinky (*Candida maltosa*) a bakterie (*Rhodococcus erythropolis*). Biodegradace VI, (2003) 39-44.

Sanační technologie I - XII : sborníky / [pořádající organizace VŠCHT v Praze, Fakulta technologie ochrany prostředí, MŽP, Vodní zdroje Ekomonitor]. - Chrudim : Vodní zdroje Ekomonitor, c1998-2009.
Futamata H., Harayama S., Watanabe K.: Appl. Environ. Microbiol. 67, 4671 (2001).

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Vladimír Čablík, Ph.D.**

Datum zadání: 31.10.2009

Datum odevzdání: 15.04.2010



prof. Ing. Vojtech Dirner, CSc.
vedoucí institutu

prof. Ing. Vladimír Slivka, CSc., Dr.h.c.
děkan fakulty

Prohlášení

Prohlašuji, že

- celou bakalářskou práci včetně příloh, jsem vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu
- byla jsem seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. - autorský zákon, zejména § 35 – využití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a využití díla školního a § 60 – školní dílo
- beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB – TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§ 35 odst. 3)
- souhlasím s tím, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB – TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci, obsažené v Záznamu o závěrečné práci, umístěném v příloze mé bakalářské práce, budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO
- bylo sjednáno, že s VŠB – TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona
- bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše)

V Ostravě dne 15.4.2010

Jana Boturová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala panu doc. Ing. Vladimíru Čablíkovi za odbornou pomoc a za čas a trpělivost při vzniku a konečné úpravě mé bakalářské práce.

Anotace

Předložená bakalářská práce se zabývá využitím kvasinek v environmentálních biotechnologiích. První kapitola této práce je věnována definici kvasinek, jejich významu, morfologii, cytologii, chemickému složení buněčné hmoty kvasinek, jejich růstu a rozmnožování. Další část se zabývá izolací kvasinek, jejich kultivací a následnou identifikací jednotlivých rodů a druhů kvasinkovitých mikroorganismů. Poslední kapitola této bakalářské práce je věnována environmentálnímu využití kvasinek. Je zaměřena na biodegradaci fenolu pomocí kvasinek *Candida tropicalis* a *Candida maltosa*, které jsou schopné využívat fenol jako zdroj uhlíku a energie, na biodegradaci chlorfenolů pomocí kvasinek *Rhodotorula rubra*, *Candida maltosa* či *Cryptococcus elinovii* a dále na použití kvasinek *Rhodotorula glutinis* a *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen jako bioflokulantů při úpravě černouhelných kalů.

Klíčová slova: kvasinky, environmentální biotechnologie, biodegradace, fenol, bioflokulant

Summary

This submitted bachelor's dissertation is dealing with the utilization of yeasts in environmental biotechnologies. The first chapter of this dissertation is devoted to the definition of yeasts, their substance, morphology, cytology, chemical composition of cytoplasm, their growth and reproduction. The next part is dealing with the isolation of the yeasts, their cultivation and the subsequent identification of particular genera and species of yeast microorganisms. The last chapter of this bachelor's dissertation is dedicated to the environmental utilization of the yeasts. Firstly it is concentrated on the biodegradation of phenol using yeasts *Candida tropicalis* and *Candida maltosa* which are capable of using phenol as a source of carbon and energy, secondly on the biodegradation of chlorophenols by means of *Rhodotorula rubra*, *Candida maltosa* or *Cryptococcus elinovii* and subsequently on the utilization of yeasts *Rhodotorula glutinis* and *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen as biofloculants at the treatment of black coal sludge.

Keywords: yeasts, environmental biotechnology, biodegradation, phenol, biofloculant

Obsah

1.	Úvod a cíl práce	1
2.	Kvasinky	2
2.1	Morfologie kvasinek.....	3
2.2	Cytologie kvasinek	3
2.2.1	Buněčná stěna	4
2.2.2	Cytoplazmatická membrána.....	5
2.2.3	Cytoplazma	5
2.2.4	Jádro	5
2.2.5	Endoplazmatické retikulum	5
2.2.6	Golgiho aparát.....	6
2.2.7	Ribozomy	6
2.2.8	Vakuola	6
2.2.9	Mitochondrie	6
2.3	Chemické složení buněčné hmoty kvasinek.....	7
2.4	Růst kvasinek.....	7
2.4.1	Voda.....	7
2.4.2	Zdroje uhlíku a dusíku	8
2.4.3	Biogenní prvky.....	8
2.4.4	Oligobiogenní prvky	8
2.4.5	Vitamíny	9
2.5	Rozmnožování kvasinek.....	9
2.5.1	Vegetativní rozmnožování kvasinek.....	9
2.5.2	Pohlavní rozmnožování kvasinek	10
3.	Izolace a identifikace kvasinek	12

3.1	Výskyt kvasinek v přírodě.....	12
3.1.1	Kvasinky ve vodách.....	12
3.1.2	Kvasinky v půdě	13
3.1.3	Kvasinky a rostliny	13
3.2	Izolace a kultivace	13
3.2.1	Izolace	13
3.2.2	Sterilizace.....	14
3.2.3	Živná půda	14
3.2.4	Očkování kultur	15
3.3	Identifikace	15
3.3.1	Rozdělení podle A. Kockové - Kratochvílové.....	15
3.3.2	Rozdělení podle způsobu pohlavního rozmnožování	21
4.	Využití kvasinek v environmentálních biotechnologiích	26
4.1	Průmyslově významné kvasinky	26
4.1.1	Pivovarnictví.....	26
4.1.2	Vinařství.....	26
4.1.3	Lihovarnictví.....	27
4.1.4	Pekařství.....	27
4.1.5	Výroba mléčných výrobků.....	27
4.1.6	Produkce biomasy	27
4.1.7	Produkce vitamínů	28
4.2	Biodegradace fenolů.....	28
4.2.1	Studium fyziologických aspektů biodegradací	29
4.2.2	Oxidace fenolu pomocí <i>Candida tropicalis</i>	29

4.2.3	Enzymy kvasinky <i>Candida tropicalis</i> podílející se na biodegradaci fenolu	30
4.2.4	Působení vnějších vlivů na biodegradační a enzymovou aktivitu kvasinky <i>Candida maltosa</i> vůči fenolickým aromátům	33
4.3	Biodegradace chlorfenolů.....	34
4.4	Biosorpce chromu z vodného roztoku a galvanických odpadních vod pomocí kvasinky <i>Candida lipolytica</i> a odvodněného čistírenského kalu.....	36
4.5	Odstranění toluenu pomocí granulovaného aktivního uhlí a kvasinky <i>Candida tropicalis</i> v bioreaktoru	36
4.6	Kvasinky jako bioflokulanty při úpravách černouhelných kalů.....	36
4.6.1	Kultivace <i>Rhodotorula glutinis</i>	37
4.6.2	Kultivace <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Hansen.....	37
4.6.3	Selektivní flokulace	38
4.6.4	Flotoflokulace a bioflotoflokulace	38
5.	Závěrečné shrnutí.....	40
6.	Seznam použité literatury	41
7.	Seznam obrázků.....	46
8.	Seznam tabulek	47

Seznam zkratek

Aj.	a jiné
Apod.	a podobně
DB5	typ kolony
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GAC	fluidní reaktor
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LCD 2563	typ detektoru
pH	potenciál vodíku, který vyjadřuje, zda je vodný roztok kyselý či zásaditý
RNA	ribonukleová kyselina
Tj.	to je
Tzv.	takzvaný
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie

1. Úvod a cíl práce

Moderní civilizace čím dál tím víc využívá v průmyslových i zemědělských technologiích různé chemické látky. Výsledkem je vzrůstající znečištění životního prostředí zahrnující vodu, vzduch i půdu. Toto znečištění představuje stále větší riziko pro ekosystémy i pro lidské zdraví. Účinnou likvidaci průmyslových, zemědělských a městských odpadů a odpadních látek umožňuje vývoj technologií a také využití velkého biodegradačního potenciálu mikroorganismů vyskytujících se v prostředí kolem nás. Biodegradační metody se ukázaly být ekonomicky přijatelnější a ekologicky šetrnější k životnímu prostředí než dosud používané postupy, zejména spalování odpadu a jeho ukládání na skládky [1].

Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy představují v těchto biodegradačních metodách zajímavý model díky svým vynikajícím vlastnostem. Protože na rozdíl od rostlinných a živočišných buněk mohou přežívat i s poruchou procesu dýchání.

Oblíbeným modelovým organismem se stala například kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, protože se jedná o mikroorganismus rychle se množící, se kterým lze pracovat pomocí mikrobiologických metod. Dále může existovat v haploidním stavu, což umožňuje snadnou přípravu různých mutantních kmenů. Její haploidní kmeny lze křížit a získávat diploidní kultury, jejichž sporulací získané haploidní potomstvo můžeme podrobovat klasické genetické analýze [2].

Cílem této bakalářské práce je podání podrobnějších informací o kvasinkách jako o mikroorganismech používaných v environmentálních biotechnologiích.

Kvasinky jsou často využívány při biodegradaci fenolů a chlorfenolů. Nejčastěji jsou v tomto procesu využívány kvasinky *Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra* či *Cryptococcus elinovii*, které jsou schopné využívat fenolu jako zdroje uhlíku a energie. Dále mohou být kvasinky využívány jako bioflokulanty při netradičních způsobech úpravy černouhelných kalů. V těchto procesech byly zkoumány a testovány kvasinky *Rhodotorula glutinis* a *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, které doposud nebyly v našich podmínkách v roli bioflokulantů testovány.

2. Kvasinky

Kvasinky jsou heterogenní eukaryotní mikroorganismy, patřící do rostlinného systému mezi houby bez chlorofylu [3].

Mikroorganismy zahrnované mezi kvasinky můžeme charakterizovat tím, že jde většinou o jednobuněčné mikroorganismy, které se rozmnožují převážně pučením a zpracovávají zdroje uhlíku převážně kvašením. Tato charakteristika ovšem nemusí platit striktně [2].

Svůj český název získaly kvasinky díky své schopnosti většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy na oxid uhličitý a ethanol [3].

Nejstarší doklady o existenci kvasinek, ze kterých lidé vyráběli nápoje podobné dnešnímu pivu a vínu, pocházejí ze sumerské a egyptské keramiky a mají také písemnou podobu v piktografických záznamech pocházejících z Babylonu. Tyto doklady jsou staré 6000 – 8000 let [2]. Poprvé však byly kvasinky spatřeny až kolem roku 1680 A. van Leeuwenhoekem jako malé kuličky v pivě. Kvasné procesy byly předmětem studia L. Pasteura. Jeho práce byly publikovány v letech 1866 a 1876. L. Pasteur v nich dokázal aktivní účast mikroorganismů na kvasném procesu [4]. Nejznámější kvasinky ovšem dostala své jméno již v roce 1837, kdy ji Theodor Schwann označil jako *Zuckerpilz*, tedy cukernou houbu. Od tohoto označení bylo odvozeno latinské pojmenování rodu *Saccharomyces* (z řeckého *sacharos* = cukr a *mykes* = houba). V roce 1883 – 1890 byly z piva izolovány první čisté kultury *Saccharomyces cerevisiae* E. Ch. Hansenem [2].

Dnešní význam kvasinek spočívá hlavně v tom, že jde o mikroorganismy hojně využívané při kvasných procesech, sloužící jako důležité modelové eukaryotní organismy, sloužící i jako zdroj vitamínu D a skupiny vitamínů B. Dále jsou využívány jako producenti některých enzymů [2].

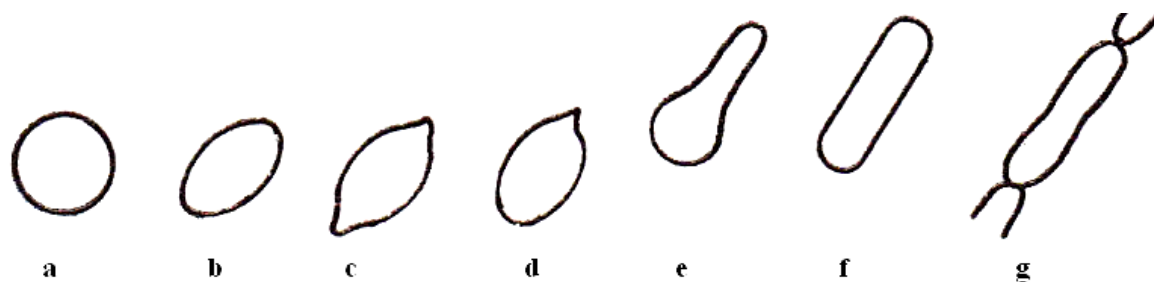
Ovšem některé kvasinky mohou tvořit nežádoucí kontaminaci při některých průmyslových výroбах. Jedná se především o ty kvasinky, které velmi dobře rostou v prostředí se zvýšeným obsahem cukrů a solí (zástupci rodu *Zygosaccharomyces*). Některé kvasinky jsou také potenciálními lidskými patogeny [5].

2.1 Morfologie kvasinek

Velikost kvasinkových buněk je pod hranicí viditelnosti pouhým okem, proto kvasinky pozorujeme vždy pod mikroskopem. Většinou se pohybuje v rozmezí od 3 do 15 μm a je větší než velikost bakteriálních buněk. Je dána rodovou příslušností, kultivačními podmínkami a stářím buněk. Šířka buněk se u většiny kvasinek pohybuje v rozmezí 3 – 6 μm .

Podobně jako velikost a šířka buněk je ovlivňován i tvar buněk. Ten se může měnit během vlastního vývoje kvasinky a do jisté míry souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování, jež se děje buď pučením nebo dělením [5].

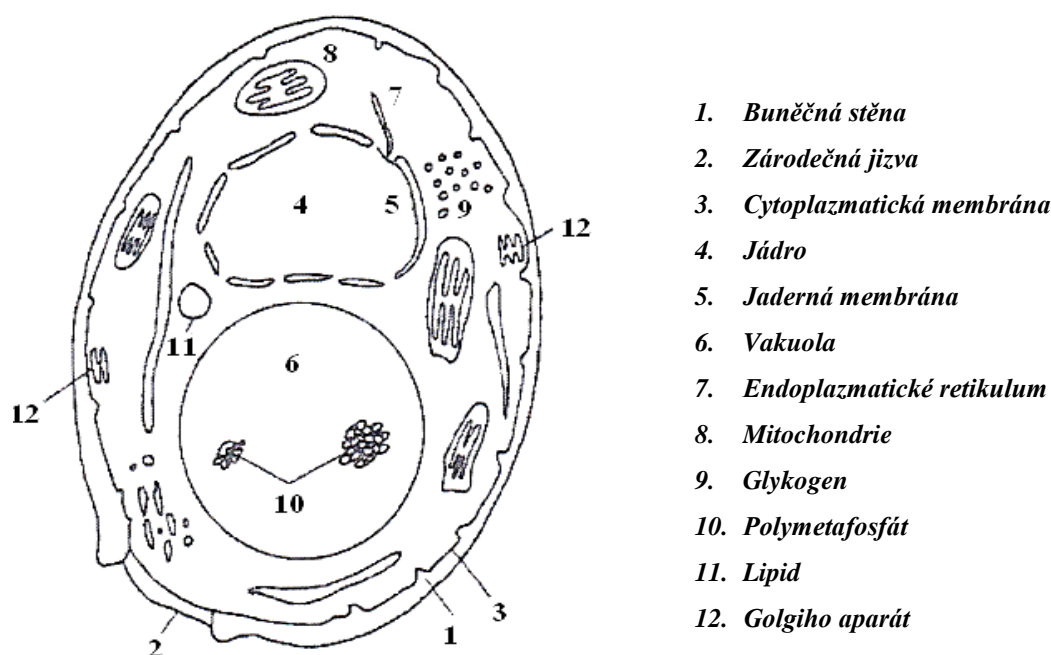
Nejčastějším tvarem kvasinkové buňky je elipsoidní tvar, ovšem běžný je i kulatý či protáhlý tvar (viz obrázek č. 1) [2].



Obrázek č. 1: Tvar buněk kvasinek. a – sférický, b – elipsoidní, c – citronkovitý, d – ogivální, e – lahvovitý, f – protáhlý, g – vláknitý [5]

2.2 Cytologie kvasinek

Jak je vidět na obrázku č. 2, vegetativní kvasinková buňka je složena ze silné a pevné buněčné stěny, jemné cytoplazmatické membrány, cytoplazmy, která obsahuje membránové struktury, a jádra, jež je od cytoplazmy odděleno jadernou membránou. Pohybové orgány, jako například bičíky, vegetativní kvasinkové buňky nemají [6].



Obrázek č. 2: Struktura buňky kvasinek [5]

2.2.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna kvasinek má silnou a pevnou strukturu, dává buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a osmotickým šokem. Tvoří přibližně 25 % suché váhy buňky. Velkými póry buněčné stěny mohou procházet všechny sloučeniny kromě sloučenin vysokomolekulárních, jako jsou bílkoviny a polysacharidy [5].

Hlavními stavebními kameny buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy, které představují 80 % sušiny stěny. Mají strukturu vláken, která tvoří hustou pevnou síť. Tato síť je vyplněna bílkoviny, které tvoří 6 – 10 % sušiny stěny. Ve stěně kvasinkové buňky je také přítomno malé množství lipidů, fosfolipidů a fosforečnanů [6].

Charakteristické struktury buněčné stěny kvasinek jsou tzv. jizvy patrné na povrchu stěny. Tyto jizvy vznikají při tvorbě pupenu oddělením dceřiné buňky od buňky mateřské. Vzniklé jizvy přetrvávají na povrchu stěny po celý život kvasinkové buňky, a proto můžeme na základě toho stanovit stáří buňky a počet pupenů, které buňka vytvořila [5].

2.2.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána kvasinek bývá někdy nazývána též plazmalema či plazmatická membrána. Je poměrně tenká (7,5 – 8 nm), složená z proteinů a lipidů. Odděluje základní cytoplazmu od vnějšího prostředí, je volně propustná jen pro malé molekuly bez náboje a vytváří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím.

Je sídlem mechanismů, které umožňují transport určitých látek z prostředí do buňky nebo z buňky do prostředí [5].

Cytoplazmatická membrána kvasinkových buněk obsahuje 50 % proteinů, 40 % lipidů, 5 % glycinů, 7 % RNA, 1 % DNA a 6 % sterolů [3].

2.2.3 Cytoplazma

Po odstranění buněčných organel zůstane vodný podíl koloidního charakteru, který označujeme jako cytoplazma či cytosol. Cytoplazma mladých buněk kvasinek se projeví ve světelném mikroskopu jako průhledná homogenní hmota, u starších buněk se objevují zrníčka a jemná nebo větší vakuolizace [5].

2.2.4 Jádro

Jádro neboli nukleus kvasinkové buňky je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry, které slouží k transportu molekul. Má poměrně malé rozměry $1,2 \cdot 1,7 \mu\text{m}$ a je umístěno přibližně ve středu buňky [5].

V jaderné hmotě můžeme rozlišit také **jadérko (nukleolus)**, které má srpkovitý tvar a je uloženo těsně pod jadernou membránou. Soustřeďuje se v něm asi pětina RNA obsažené v jádře. Zaniká během dělení jádra [6].

V jádře kvasinek je také zřetelné **pólové tělísko vřeténka**. Má tvar disku a vycházejí z něj vlákna zvaná **mikrotubuly** složené z bílkovin tubulinu. Spolu s tělískem hrají důležitou roli při dělení jádra během dělení buněk [5].

2.2.5 Endoplazmatické retikulum

Cytoplazma kvasinek obsahuje systém dvojitých membrán, který se nazývá endoplazmatické retikulum. Vytvářejí ho cisterny, lamely a tubuly, které obsahují různé

enzymy a rezervní látky. Vnější membránou je spojeno s cytoplazmatickou membránou a též s jadernou membránou.

Podle struktury rozlišujeme hladké a drsné endoplazmatické retikulum. Na vnější membránu drsného endoplazmatického retikula jsou navázány ribozomy a je to tedy místo syntézy proteinů. Hladké endoplazmatické retikulum se podílí na produkci steroidů [5].

2.2.6 Golgiho aparát

Další útvar v cytoplazmě kvasinkové buňky je Golgiho aparát. Má tvar plochého měchýřku. Hlavní funkce tohoto systému spočívá v úpravě produktů syntetizovaných v endoplazmatickém retikulu [5].

2.2.7 Ribozomy

Ribozomy kvasinkové buňky jsou sférické organely velké 20 – 30 nm. V cytoplazmě kvasinek mohou být volné či vázané na membrány endoplazmatického retikula. Předpokládá se, že na ribosomech vázaných na membránu probíhá biosyntéza bílkovin [5].

2.2.8 Vakuola

Vakuola patří k nejnápadnějším organelám cytoplazmy kvasinek. Jedná se většinou o kulovitý útvar obklopený jednoduchou membránou (tonoplastem). U mladých či pučících buněk jsou většinou přítomny malé vakuoly, ale ve větším počtu, zatímco zralé buňky obsahují jednu velkou vakuolu. U starších buněk může vakuola vyplňovat celý prostor buňky [6].

Vakuoly jsou důležitou zásobárnou vody a podílejí se na homeostázi vnitrobuněčného pH [5].

2.2.9 Mitochondrie

Dalším útvarem v cytoplazmě kvasinek jsou mitochondrie. Jedná se o strukturální útvary velmi rozmanitého tvaru (kulovité, válcovité, vláknité). Jsou dlouhé až 3 μm a široké 0,3 – 1 μm . Jejich počet a tvar závisí na druhu kvasinky, růstové fázi či na kultivačním prostředí. Mohou tvořit více než 10 % celkového objemu buňky [6].

Mitochondrie kvasinek jsou složeny z proteinů, lipidů a fosfolipidů. Obsahují též RNA a malé množství DNA, která je nositelem mimojaderné dědičnosti kvasinek. Jsou tvořeny dvěma membránami – vnitřní a vnější [5].

2.3 Chemické složení buněčné hmoty kvasinek

Hlavní složkou cytoplazmy kvasinkovitých mikroorganismů je voda. Její obsah se pohybuje od 65 do 80 % a závisí na druhu kvasinky, stáří buňky či na kultivačních podmínkách tzn. například na druhu živné půdy, na které byla kvasinka rozmnožována.

Na stejných podmínkách závisí i složení sušiny kvasinkových buněk. Hlavní podíl sušiny tvoří bílkoviny (50 %), dále glykogen (30 %), nukleové kyseliny (10 %), polysacharidy (5 %) a popel (8 %).

Z organických sloučenin se v nízkých koncentracích vyskytují především vitamíny skupiny B (B_1 , B_2 , B_6), provitamin D (ergosterol) a u některých druhů (např. *Rhodotorula*) též provitamin A (β -karoten). Na vitamíny skupiny B jsou bohaté především pivovarské kvasnice.

V popelu je hlavní složkou oxid fosforečný (45 – 60 %). Z iontů kovů je zastoupen v největším množství K^+ , mnohem méně jsou zastoupeny ionty Mg^{2+} , Ca^{2+} a Na^+ a ostatní prvky se vyskytují pouze ve zlomcích procent [3].

2.4 Růst kvasinek

Růstem buněk rozumíme zvětšování obsahu buňky (velikosti, objemu).

Kvasinky potřebují pro svůj růst a rozmnožování správnou výživu. Tu přijímají ze živného prostředí, které musí splňovat řadu předpokladů. Mezi základní složky výživy patří voda, zdroj uhlíku a dusíku, biogenní prvky, oligobiogenní prvky a vitamíny [7].

2.4.1 Voda

Prostředí, ve kterém kvasinky žijí, musí být dostatečně vlhké, a proto musí obsahovat dostatek vody, alespoň 30 %.

Voda zabezpečuje především transport látek z buňky do prostředí a z prostředí do buňky a odvádí nadbytečné teplo [7].

2.4.2 Zdroje uhlíku a dusíku

Kvasinky potřebují uhlík a dusík nejčastěji ve formě organických sloučenin.

Uhlík zpracovávají nejčastěji ve formě sacharidů. Mezi základní sacharidy patří hexózy, D-glukóza, D-fruktóza a D-manóza. Ovšem jako zdroj uhlíku mohou kvasinky využívat i polysacharidy jako rozpustný škrob, pektin nebo alkoholy jako ethanol, methanol či glycerol anebo jiné organické kyseliny.

Jako zdroj dusíku využívají kvasinky nejčastěji organické sloučeniny. Dalšími látkami, které jsou kvasinky schopné využít, jsou amonné soli (síran, fosforečnan, dusičnan amonný). Amonné soli organických kyselin jsou lépe využitelné jako soli anorganických kyselin, poněvadž po rozložení těchto látek vzniknou slabé organické kyseliny, které mohou sloužit jako zdroj uhlíku [7].

2.4.3 Biogenní prvky

Mezi biogenní prvky patří kyslík, vodík, uhlík, dusík, fosfor a hořčík. Jsou to prvky důležité na výstavbu živé hmoty kvasinky. Svědčí o tom i podíl těchto prvků v popelu sušiny kvasinkových buněk. Jak je vidět v tabulce č. 1, fosfor tvoří 45 – 60 % popela, hořčík přibližně 6 % a vápník přibližně 2,85 % popela [7].

Tabulka č. 1: Složení popela kvasinek [7]

Složky popela	Podíl [%]
P ₂ O ₅	45 – 60
K ₂ O	25 – 40
CaO	1 – 8
MgO	3,7 – 6,5
SiO ₂	3,7 – 6,5
SO ₃	0,57 – 6,2
Fe ₂ O ₃	0,07 – 0,7
Cl	0,1 – 0,65

2.4.4 Oligobiogenní prvky

Oligobiogenní prvky jsou potřebné pouze v malém množství. Patří k nim i prvky stopové (jód, kobalt, zinek, měď apod.) a mikroelementy. Přidáním těchto prvků

ve správném poměru do živného prostředí podpoříme rozmnožování kvasinek avšak v nesprávném poměru či ve větším množství mohou být toxické [7].

2.4.5 Vitamíny

V buňkách kvasinek se uplatňuje mnoho vitamínů, hlavně však vitamíny skupiny B jako B₁, B₂ a B₆, provitamin D a u některých rodů provitamin A [3].

2.5 Rozmnožování kvasinek

Kvasinky se mohou rozmnožovat vegetativním způsobem nebo tvorbou pohlavních spor tedy pohlavně [3].

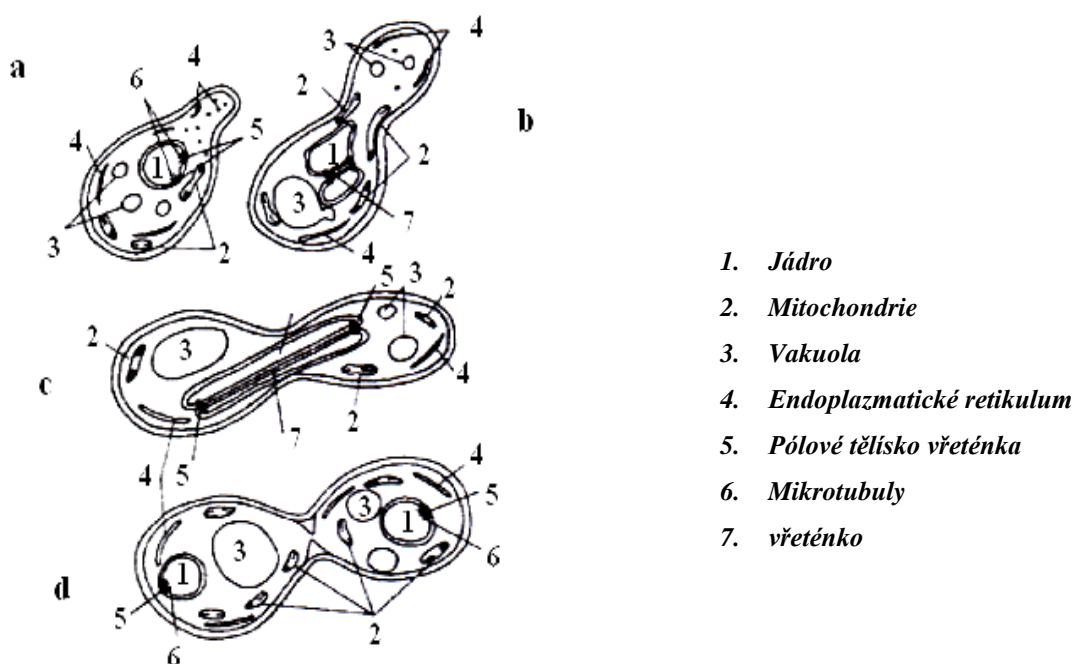
2.5.1 Vegetativní rozmnožování kvasinek

Vegetativně se kvasinky mohou rozmnožovat pučením nebo příčným dělením. Většina rodů kvasinek se však rozmnožuje pučením [5].

Při pučení vzniká malá dceřiná buňka, neboli pupen, která je kanálkem spojena s buňkou mateřskou. Před pučením dojde ke splývání membrán endoplazmatického retikula a následně k jeho dělení. Dále dochází k opakovanému dělení vakuol a ke změně tvaru mitochondrií z tvaru kulovitého, válcovitého či vláknitého na dlouze protáhlý. Při tvorbě pupenu do něj vstupují drobné vakuoly a mitochondrie. Současně začíná mitotické dělení jádra a jeho migrace k pupenu. Současně s jádrem přecházejí do nově vzniklého pupenu i další složky cytoplazmy. Pak se kanálek mezi mateřskou a dceřinou buňkou cytoplazmatickou membránou uzavře a v pupenu se intenzivně syntetizuje endoplazmatické retikulum. Jakmile se vytvoří buněčná stěna mezi mateřskou a dceřinou buňkou, vzroste velikost pupenu a drobné vakuoly se spojí v jednu vakuolu, je pučení ukončeno. Schéma pučení kvasinek je popsáno také na obrázku č. 3.

Většinou se dorostlá dceřiná buňka oddělí od buňky mateřské ihned.

Celý cyklus buněčného dělení od vytvoření drobného pupenu až po oddělení dceřiné buňky od buňky mateřské trvá za optimálních podmínek kolem dvou hodin [6].



Obrázek č. 3: Schéma pučení kvasinek [6]

Příčné dělení se u kvasinek vyskytuje zřídka (např. u rodu *Schizosaccharomyces*).

Při tomto způsobu dělení se nejprve proslouží růstem na pólech mateřská buňka. Toto se obvykle děje na pólu proti zárodečné jizvě. Jakmile mateřská buňka dosáhne dvojnásobné délky, vytvoří se přepážka dávající vznik dvěma novým stejným buňkám. Buňka se dvěma jizvami narůstá na pólech tak, že k původnímu stěnovému prstenci přiroste na jednom nebo obou pólech nová stěna. Jelikož se jizvy překrývají, není možné stanovit počet dělení na základě počtu jizev [5].

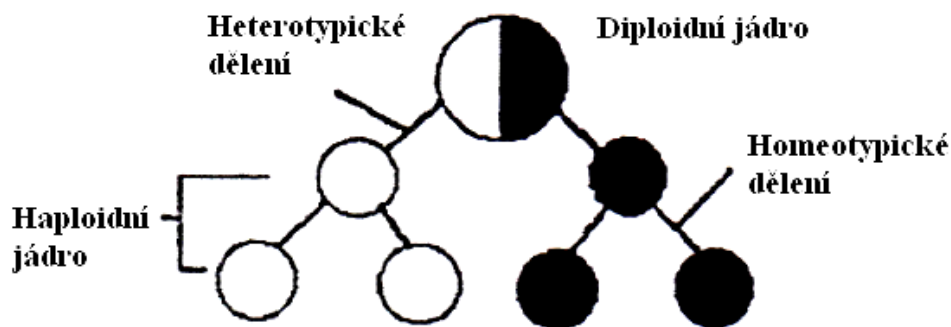
2.5.2 Pohlavní rozmnožování kvasinek

Vedle vegetativního rozmnožování se u většiny kvasinek setkáváme i s pohlavním způsobem rozmnožování. Jeho výsledkem jsou pohlavní spory [5].

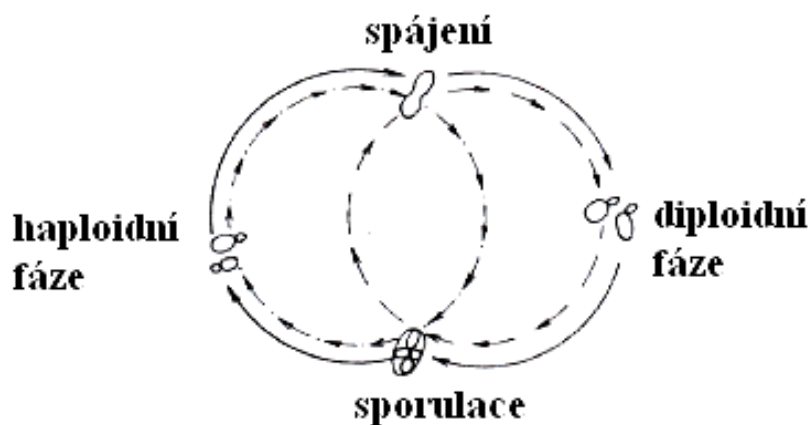
Většina rodů kvasinek tvoří jako pohlavní spory askospory, což jsou endospory umístěné ve vřecku (asku). Proto tyto kvasinky řadíme mezi *Ascomycotina*. Některé kvasinky však tvoří pohlavní exospory, tj. spory umístěné vně sporotvorných buněk. Tyto kvasinky řadíme mezi *Basidiomycotina* [6].

Pohlavní způsob rozmnožování kvasinek je charakterizován spájením dvou dhaploidních buněk tedy konjugací a spájením jejich jader čili karyogamií za vzniku diploidního jádra. Potom se diploidní jádra dělí meiózou, tj. redukčním dělením, na čtyři haploidní jádra, která jsou základem pohlavních spor nebo se dělí další mitózou a teprve pak vznikají spory. V životním cyklu kvasinek se tedy pravidelně střídá haploidní a diploidní fáze buněk, viz obrázek č. 4 [3].

U askosporogenních kvasinek dochází při spájení dvou haploidních buněk také ihned ke spájení jejich jader (karyogamii). Vznikne diploidní buňka zvaná zygota. Pokud dojde ke spájení dvou přibližně stejně velkých buněk, hovoříme o izogamním spájení. Nastává například u rodu *Saccharomyces*. Jde-li o spájení velké buňky s malou, například mateřské buňky s buňkou dceřinou, jedná se o heterogamní spájení. Nastává například u rodu *Debaryomyces* [6].



Obrázek č. 4: Schéma pohlavního rozmnožování kvasinek [3]



Obrázek č. 5: Střídání haploidní a diploidní fáze u kvasinek [6]

3. Izolace a identifikace kvasinek

3.1 Výskyt kvasinek v přírodě

Většina druhů kvasinek se vyskytuje a rozmnožuje ve vysoce specializovaném prostředí, zejména tam, kde je dostatek vody a sacharidů [8].

Můžeme je nalézt ve vodě, v půdě, na listech rostlin, v květech, v hojné míře se vyskytují v zahnívajících kaktusech či na kazících se plodech a ovoci. Izolujeme je z potravin, z průmyslových provozů apod. Jsou přenášeny hmyzem, některé druhy jsou potencionálními patogeny vyvolávající onemocnění u oslabeného organismu.

Výskyt kvasinek v přírodě závisí na řadě faktorů. Mimo jiné na výskytu zdrojů uhlíku a dusíku, na přítomnosti antibiotik a některých mastných kyselin [2].

3.1.1 Kvasinky ve vodách

Obvyklá množství kvasinek ve vodách se liší podle typu a čistoty vody. V čistých vodách oceánu se vyskytuje asi 10 kvasinek/l (počet klesá se vzdáleností od pobřeží a s hloubkou). V jezerech bývá asi 100 kvasinek/l a v silně znečištěných odpadních vodách můžeme zjistit až $10^5 - 2 \cdot 10^8$ kvasinek/l.

Ve vodě převládají „barevné“ kvasinky. Více než 50 % tvoří červené kvasinky (*Rhodotorula*, *Rhodospiridium*). Z askomycet se v mořské a sladké vodě nejčastěji vyskytuje druh *Debaryomyces hansenii*. V arktických vodách je nalézáno *Leucosporidium*, v odpadních vodách se vyskytuje *Candida parapsilosis*. Velké množství kvasinek se vyskytuje v planktonu (*Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*). V domovních odpadních vodách můžeme najít *Saccharomyces exiguus*, *Candida albicans* - jako indikátor fekálního znečištění, *Hansenula anomal*. Ve vodách znečištěných oleji se vyskytují kvasinky zpracovávající olej, například *Candida lipolytica*, *Candida maltosa* nebo *Candida tropicalis*.

Některé kvasinky byly nalezeny v tělech mořských živočichů. U delfínů *Candida albicans* či *Candida glabrata*. *Candida albicans* byla nalezena také na skořápkách ústřic a vědci se domnívají, že zde způsobuje jejich deformace. U koryšů působí kvasinka *Metschnikowia* jako patogen [2].

3.1.2 Kvasinky v půdě

Kvasinky jsou zastoupeny hlavně v povrchových vrstvách půdy a to do hloubky asi 15 cm. Vyskytuje se zde asi $10^5 - 10^6$ kvasinek/g, což je mnohem menší množství než bakterií či plísní. Naproti tomu v Antarktidě jsou kvasinky dominujícími mikroorganismy. Nejčastěji se zde vyskytují *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Leucosporidium* či *Rhodotorula*.

V půdě dobře přežívají sportující kvasinky nebo kvasinky, které vytvářejí pouzdro. *Schwanniomyces*, *Lipomyces* a některé druhy *Cryptococcus* jsou typickými půdními rody. Jejich typickými vlastnostmi jsou schopnost štěpit cellobiosu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu a výrazná hydrolytická aktivita. Ovšem předpokládá se, že nehrají výraznější úlohu v rozkladu půdní organické hmoty [2].

3.1.3 Kvasinky a rostliny

Kvasinky se vyskytují především v rostlinných exudátech, kde žijí ve společenství prvoků a bakterií. Vysoce specifická jsou společenství mikroorganismů žijící v exudátech zahrňujících kaktusů. Zde se vyskytuje hlavně *Pichia cactophila*, *Candida ingens* či *Cryptococcus cereanus*.

Na listech rostlin se vyskytují především nesporogenní, nefermentativní druhy jako *Cryptococcus*, *Rhodotorula* nebo *Sporobolomyces*. Během sezóny dochází ke značným kvantitativním změnám v zastoupení kvasinek (maximálně mohou dosáhnout až $10^6 - 10^7$ buněk na gram čerstvé váhy) a také v zastoupení jednotlivých druhů (např. druh *Sporobolomyces* 6 % zastoupení v zimě, ale 92 % na podzim).

V květech rostlin jsou přítomny hlavně oxidativní typy kvasinek jako *Cryptococcus albidus*, *Metschnikowia pulcherrima* či *Aureobasidium* [2].

3.2 Izolace a kultivace

3.2.1 Izolace

Izolaci kvasinek z vody provádíme u málo znečištěných vod filtrací a u silně znečištěných vod ředěním. Přítomnost kvasinek na listech prokazujeme otiskem listu na agarovou půdu nebo přímo mikroskopicky na barevném preparátu listu [2].

3.2.2 Sterilizace

Při práci s kvasinkami se nejčastěji používají nádoby z hrubého skla, které snášejí vyšší teploty, poněvadž je musíme sterilizovat suchým teplem nebo v páře. Nové nádoby nejprve vymyjeme mýdlovým roztokem, dobře vypláchneme vodou a poté ještě opláchneme vodou destilovanou. Nádoby již použité na kultivaci kvasinek či různé testy nevymýváme přímo, ale nejprve je sterilizujeme v páře.

Sterilizace je proces, kdy odstraňujeme mikroorganismy a jejich zárodky z prostředí a předmětů.

Sterilizace teplem je vůbec nejstarší metodou sterilizace. Je to dnes nejrozšířenější a nejpoužívanější metoda. Sterilizaci v horkém vzduchu sušíme a sterilizujeme pouze čisté sklo a jen nehořlavé látky. Regulace teploty je od 60 do 200 °C. Při sterilizaci parou se živné půdy sterilizují vlhkým teplem a je možné používat nižší teploty než při sterilizaci horkým vzduchem. Při teplotě 120 °C probíhá sterilizace asi půl hodiny, při teplotě 134 °C pouze 10 minut [9].

3.2.3 Živná půda

Jako všechny živé organismy potřebují i kvasinky pro svůj život správnou výživu. Prostředí, kde jim tuto výživu poskytneme, se nazývá živná půda, živné prostředí či živné médium.

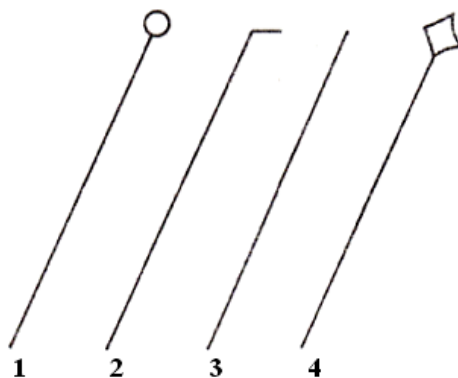
Živná půda by měla splňovat tyto předpoklady: musí mít dostatek vody (asi 30 % vlhkosti), musí obsahovat základní složky pro heterotrofní organismy jako zdroje uhlíku a dusíku, fosfor či hořčík, dále musí obsahovat stopové prvky, mikroelementy a vitamíny a také musí mít určité pH, tj. 6 nebo nižší.

Podle konzistence rozdělujeme živné půdy na kapalné a tuhé. Tuhé neboli zpevněné živné půdy jsou používány častěji. Při přípravě zpevněné živné půdy se používá rosolující látka, jako například želatina, škrob, kyselina křemičitá, nejčastěji však agar, což je polysacharid připravovaný z mořských řas rodu *Gelidium* žijících v Indickém oceánu nebo z *Euchlena* a *Acanthoptelis* rostoucích v Čínském moři [9].

3.2.4 Očkování kultur

Na kapalných nebo zpevněných živných půdách se kvasinky rozmnožují do té doby, dokud nespotřebují všechny živiny. Poté začínají odumírat je třeba je přeočkovat na čerstvou živnou půdu.

Očkujeme tak, abychom novou živnou půdu nekontaminovali jinými mikroorganismy, ale pouze čistou kulturou. Proto očkujeme ve sterilním prostředí a těsně u plamene, který použijeme na vyžihání očkovacího drátu, nejčastěji kličky. Tuto kličku necháme asi 15 vteřin ochladnout a očkujeme kulturu na živnou půdu. Příklady očkovacích drátů jsou znázorněny na obrázku č. 6 [9].



Obrázek č. 6: Očkovací dráty. 1 – smyčka, 2 – skoba, 3 – jehla, 4 – lanceta [9]

3.3 Identifikace

Většina popisů a zařazení jednotlivých rodů a druhů kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů vychází z hypotézy, že jsou kvasinky redukované formy hub a považují se za vývojově starší než jednobuněčné formy [2].

3.3.1 Rozdělení podle A. Kockové - Kratochvílové

Podle A. Kockové – Kratochvílové charakterizuje kvasinkovitý mikroorganismus kvasinková fáze v rámci životního cyklu rodu [2].

Kvasinky řadíme v systému hub (*Fungi*) mezi vlastní houby (*Eumycety*) a to do dvou velkých pododdělení: vřeckovýtrusné houby (*Ascomycota*) a stopkovýtrusné houby

(*Basidiomycota*). Anamorfní formy kvasinek neboli kvasinky, u kterých není známo pohlavní rozmnožování, se řadí do pomocného pododdělení *Deuteromycota*. V systému vřeckovýtrusných hub se vyskytuje velká skupina kvasinek, která je zařazována do *Endomycetes* [4].

Endomycetes

Kvasinky patřící do skupiny *Endomycetes* členíme na:

1. kvasinky dělicí se přehrádkami a kvasinkovité mikroorganismy s pravým myceliem,
2. jednobuněčné pučící kvasinky,
3. skupiny anamorfních forem askogenních kvasinek.

Kvasinky dělicí se přehrádkami a kvasinkovité mikroorganismy s pravým myceliem dělíme na:

- a) kvasinkovité mikroorganismy s koherentním myceliem,
 - b) kvasinkovité mikroorganismy s disartikulovaným myceliem [2].
1. Kvasinky dělicí se přehrádkami a kvasinkovité mikroorganismy s pravým myceliem
 - a) Kvasinkovité mikroorganismy s koherentním myceliem

Mezi kvasinkovité mikroorganismy s koherentním myceliem patří předpokládání předchůdci endomycet jako jsou rody *Dipodascopsis* (*Dipodascus*), *Ascoidea* či *Eremascus* (*Ascoideaceae*). Z ostatních rodů této čeledi uvádím rod *Saccharomycopsis*, který byl izolován z povrchu chleba, kde vytváří křídovité skvrny. Tento rod dále produkuje řadu hydrolytických enzymů, a proto je často používán v jihovýchodní Asii k výrobě různých nápojů a potravin. Dalším rodem této čeledi je rod *Yarrowia*, který se stal středem zájmu jako model kvasinek rozmnožujících se v médiu s n-alkany a také tvorbou kyseliny citronové při kultivaci v tomto médiu [2]. Vytvořili ho roku 1980 Van der Walt a Von Arx na základě anamorfního druhu *Candida lipolytica* [10]. Dalšími rody, které se vyznačují tvorbou jehlicovitých spor, jsou rod *Nematospora*, rod *Metschnikowia* a rod *Coccidiascus*, které jsou sdruženy v čeledi *Spermophthoraceae*. Rod *Nematospora* představuje určitý přechod mezi myceliálními a kvasinkovými formami. Jediný druh tohoto rodu *Nematospora coryli* parazituje na tropických a subtropických

rostlinách a také byl izolován jako původce chorob lískových ořechů. Zástupci rodu *Metschnikowia* se hojně vyskytují ve vodách, na plodech nebo v kvasících moštích [2].

b) Kvasinkovité mikroorganismy s disartikulovaným myceliem

Mezi kvasinkovité mikroorganismy s disartikulovaným myceliem patří *Endomycetaceae* a *Schizosaccharomyceteceae*. Mezi *Endomycetaceae* patří rody *Dipodascus*, *Geotrichum* a *Trichosporon*. Velmi rozšířeným zástupcem rodu *Geotrichum* je *Geotrichum candidum*. Tento druh byl izolován ze zubního kazu a vyskytuje se v mléčných výrobcích, okurkách, v kyselém zelí, ale i v půdě nebo jako sekundární patogen u člověka, kde velmi často doprovází různé kandidózy [2]. Na agarových půdách vytváří jemné kožešinové porosty a jeho kolonie rostou nejrychleji ze všech *Geotrich* [11]. Rod *Trichosporon* se vyskytuje jako saprofyt i parazit lidí a zvířat a je původcem některých mykóz. Mezi *Schizosaccharomyceteceae* patří rody *Schizosaccharomyces*, *Schizoblastosporion* a *Malassezia*. Rod *Schizosaccharomyces* je zastoupen jednobuněčnými organismy rozmnožujícími se dělením. Je používán k přípravě kvašených nápojů především v tropických oblastech, poněvadž zkvašuje cukry. Rod *Schizoblastosporion* se vyskytuje v půdě a rod *Malassezia* je patogenní pro člověka a některá zvířata [2].

2. Jednobuněčné pučící kvasinky

Jednobuněčné pučící kvasinky dělíme na tři čeledi:

- a) *Saccharomycodaceae*,
- b) *Lipomycetaceae*,
- c) *Saccharomycetaceae*.

Do čeledi *Saccharomycodaceae* patří rod *Hanseniaspora*, rod *Kloeckera*, rod *Saccharomycodes*, rod *Nadsonia* a rod *Wickerhamia*. Mnoho zástupců těchto rodů se vyskytuje v kvasícím hroznovém moštu.

Mezi čeleď *Lipomycetaceae* patří rod *Lipomyces* a rod *Waltomyces*. Tyto kvasinky nezkvašují cukry [2].

Poslední čeledí jednobuněčně pučících kvasinek je čeleď *Saccharomycetaceae*. K této čeledi řadíme dvě skupiny kvasinek podle toho, jestli:

- na kapalně živné půdě tvoří povlaky nebo prstence,
- převážně sedimentují a podle jejich schopnosti zkvašovat cukry.

Kvasinky tvořící na kapalně živné půdě povlaky a prstence jsou především ty kvasinky, které zkvašují cukry velmi slabě nebo je nezkašují vůbec. Tato skupina kvasinek je dále dělena podle tvaru spor na:

- a) rody s kloboukovitými sporami,
- b) rody s kulatými sporami, rody s bradavčitými sporami,
- c) rody se saturnovitými sporami [2].

Mezi rody s kloboukovitými sporami patří rody *Pichia*, *Hansenula*, *Dekkera* a *Brettanomyces*. Rod *Pichia* patří dnes mezi největší rody. Obsahuje velký počet druhů (asi 40). Nejznámějšími zástupci jsou *Pichia methanolica*, *Pichia pastoris* či *Pichia stipitis*, které jsou biotechnologicky využitelné [2]. A *Pichia membranaefaciens* Hansen, která se vyskytuje jako kontaminace na hroznovém vínu a moštu [12].

Jediným zástupcem kvasinek s kulatými sporami je rod *Debaryomyces*.

Mezi kvasinky s bradavčitými sporami patří rod *Schwanniomyces*. Dříve se v rámci tohoto rodu rozlišovaly čtyři druhy a to *Schwanniomyces occidentalis*, *Schwanniomyces alluvius*, *Schwanniomyces castelli* a *Schwanniomyces personii*. V současné době jsou tyto druhy sdružovány v jeden a to v *Schwanniomyces occidentalis*.

A rod *Williopsis* patří mezi kvasinky se saturnovitými sporami. Tyto kvasinky dříve patřily do rodu *Hansenula* [2].

Jednobuněčné sedimentující kvasinky jsou především ty, které zkvašují cukry. Do této skupiny patří čtyři rody:

- a) rod *Saccharomyces*,
- b) rod *Zygosaccharomyces*,
- c) rod *Kluyveromyces*,
- d) rod *Torulaspora*.

Rod *Saccharomyces* patří k nejstarším a nejznámějším rodům kvasinek. Nejznámějším zástupcem tohoto rodu je *Saccharomyces cerevisiae* používaný v potravinářském průmyslu zejména pro výrobu piva, vína, ethanolu a pekařského droždí. Dalšími zástupci jsou například *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces logos*,

Saccharomyces monacensis [2] či *Saccharomyces ludwigii*, který se vyskytuje v silně šířených mladých vínech, na povrchů hroznů a v mošttech [13].

Kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* se svými vlastnostmi podobají rodu *Saccharomyces*, do kterého původně patřily. K zástupcům těchto kvasinek patří *Zygosaccharomyces bailii*, která kontaminuje víno.

Také kvasinky rodu *Kluyveromyces* dříve patřily do rodu *Saccharomyces*. Byly však vyčleněny na základě odlišných vlastností. Příkladem může být zkvašování cukrů pouze do koncentrace cca 4 % ethanolu nebo biomasa, která často obsahuje hnědočervené heminové barvivo [2]. Ze zástupců uvádím *Kluyveromyces lactis*, který je součástí keřirových zrn a rovněž se používá při výrobě sýrů s plísní uvnitř [14] a *Kluyveromyces bulgaricus*, které zkvašují laktosu a mají biotechnologický význam při zpracování syrovátky [2].

Posledním rodem této skupiny kvasinek je rod *Torulaspora*, který rovněž zkvašuje cukry [2].

3. Skupiny anamorfních forem alogenních kvasinek

Skupinu anamorfních forem askogenních kvasinek zastupuje především velký rod *Candida*. Z velkého počtu druhů tohoto rodu uvádím jen neznámější a nejdůležitější zástupce. *Candida albicans* je značně rozšířená patogenní kvasinka. *Candida parapsilosis* se vyskytuje jako kontaminant potravin a také na různých místech těla člověka i zvířat [2]. *Candida ulitis* se používá jako biomasa krmného droždí [15] a *Candida ethanolica* lze použít k produkci biomasy pro krmivářské účely. *Candida kefir* zkvašuje laktosu a *Candida vini* využívá ethanol, glycerol a některé organické kyseliny a za přístupu vzduchu kontaminuje pivo a víno [2].

Basidiomycetes

Tato skupina kvasinek se vyznačuje znaky charakteristickými pro basidiomycety. Cukry zkvašuje jen ojediněle nebo vůbec a dělí se do pěti základních skupin:

- a) červené kvasinkovité organismy,
- b) kvasinky bez červené pigmentace,
- c) černé kvasinkovité organismy,

- d) kvasinky pučící na sterigmatech,
- e) slizovité kvasinkovité organismy rodu *Candida* basidiomycetového původu [2].

Červené kvasinkovité organismy tvoří červené barvivo karotenoidní povahy, které je nerozpustné ve vodě a nachází se na vnitřní straně plazmatické membrány. Podmínkou tvorby tohoto barviva je přístup kyslíku a dostatek světla. Do této skupiny kvasinek patří rody *Rhodosporidium*, *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula*, *Dioszegia*, *Phaffia*, karotenoidní kvasinky tvořící balistokolonie, rod *Sporobolomyces* a rod *Sporidiobolus*. Kvasinky rodu *Rhodotorula* jsou rozšířeny ve vzduchu, v půdě, ve sladkých i slaných vodách, na rostlinách a v různých orgánech živočišného těla nebo ve vinařských provozech [2]. Nejčastěji se v přírodě vyskytuje *Rhodotorula glutinis*. Je to kvasinka rozšířená po celém světě a dá se izolovat z půdy, ze vzduchu, ze sladké i slané vody, z povrchu rostlin nebo z různých orgánů živočišného těla [16]. Dalšími zástupci jsou například *Rhodotorula graminis* nebo *Rhodotorula rubra*. Jediným druhem rodu *Dioszegia* je *Dioszegia hungarica*, který byl izolován z půdy a který tvoří oranžovočervené kolonie a jediným zástupcem rodu *Phaffia* je *Phaffia rhodozyma*, který byl izolován z exsudátů stromů v USA a Japonsku a který se od ostatních červených kvasinek liší tím, že kvasí cukry. Tato kvasinka může být díky své vysoké výživové hodnotě použita také při pěstování různých drobných živočichů (perlooček, prvoků). Do skupiny karotenoidních kvasinek, které tvoří balistokolonie, patří kvasinky zbarvené karotenoidními pigmenty růžově, oranžově nebo červeně. Zástupci rodu *Sporobolomyces* se velmi podobají kvasinkám rodu *Rhodotorula* a často se vyskytují jako kontaminanty potravin, vinařských zařízení nebo rostlinného materiálu [2].

Mezi kvasinky bez červené pigmentace patří rod *Bullera*, rod *Kockovaella*, rod *Cryptococcus*, rod *Filobasidiella*, rod *Filobasidium* a rod *Leucosporidium*. Rod *Bullera* tvoří krémové, plet'ové nebo světle žluté kolonie. Rod *Kockovaella* je velmi blízký rodu *Bullera* a je pojmenován podle A. Kockové-Kratochvílové na její počest. Rod *Cryptococcus* se vyznačuje utilizací inositolu jako jediného zdroje uhlíku. Kvasinky patřící do rodu *Leucosporidium* tvoří světle krémové kolonie, které vytváří slizovitou hmotu. Žijí většinou při nízkých teplotách, a proto je možné je izolovat z oceánů, z prostředí Arktidy nebo ze zmrazených potravin [2].

Do skupiny černých kvasinkovitých organismů se řadí kvasinky, které jsou schopné tvořit černé barvivo melanin. Toto barvivo chrání buňky před vyschnutím a změnami v obsahu kyslíku ve vzduchu. Patří zde rod *Aureobasidium*. Zástupce tohoto rodu, *Aureobasidium pullulans*, je v přírodě hojně rozšířen [2]. Snáší velmi dobře nízké teploty a je prvním mikroorganismem s kvasinkovou fází, který lze izolovat v severnějších částech Evropy [17]. Také je schopen tvořit v médiích s různými cukry směs pullulanu. Tato sloučenina je biotechnologicky velmi významná pro výrobu biopolymerů. *Aureobasidium* je také využitelné v praxi, protože rozkládá celulózu, lignin nebo škrob. Působí ale také škodlivě, protože rozrušuje elektrické kabely, skleněnou optiku a rozkládá barviva [2].

Další skupinou jsou kvasinky pučící na sterigmatech. Mezi tyto kvasinky patří rody *Sterigmatomyces* a *Sterigmatosporidium* [2].

Poslední skupinou jsou slizovité kvasinkovité organismy rodu *Candida* basidiomycetového původu. Tyto kvasinky se vyznačují tvorbou sliznatých kolonií. Řada druhů byla izolována z vod, například *Candida marina* nebo *Candida aquatica* [2].

3.3.2 Rozdělení podle způsobu pohlavního rozmnožování

Mezinárodní publikace „The Yeasts. A Taxonomic Study“ rozděluje kvasinky podle způsobu pohlavního rozmnožování do tří hlavních skupin:

1. rody tvořící askospory,
2. rody tvořící bazidiospory nebo sporidie a heterokaryotní mycelium s přezkami
3. rody, u nichž není známa tvorba pohlavních spor [6].

1. Rody tvořící askospory

Rody této skupiny jsou řazeny mezi *Ascomycotina* a to do třídy *Hemiascomycetes* a řádu *Endomycetales*. Dále můžeme tuto skupinu rozdělit podle vegetativního rozmnožování na:

- a) rody, které se rozmnožují vegetativně multilaterálním pučením,
- b) rody rozmnožující se vegetativně bipolárním pučením na široké základně,
- c) rody rozmnožující se vegetativně dělením [6].

Technologicky nejdůležitějším rodem skupiny kvasinek rozmnožujících se vegetativně multilaterálním pučením je rod *Saccharomyces*. Zástupci tohoto rodu jsou schopni zkvašovat většinou několik cukrů. Nejdůležitějším a nejvýznamnějším druhem je *Saccharomyces cerevisiae* [6]. Tato kvasinka vytváří elipsoidní nebo kulovité buňky s rozměry $3,7 - 9,7 \cdot 2,6 - 6,4 \mu\text{m}$ [18]. Uplatňuje se jako pekařská, vinařská, lihovarská či pivovarská kvasinka. Zkvašuje glukosu, sacharosu, maltosu, galaktosu a částečně také trisacharid rafinosu. Tento druh je neprostudovanější kvasinkou, poněvadž slouží jako modelový mikroorganismus v biochemii a genetice. Dalším zástupcem tohoto rodu je například kvasinka *Saccharomyces carlsbergensis* [6] či *Saccharomyces uvarum*, která vytváří buňky stejných tvarů a rozměrů jako kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a v kapalném mediu vytváří sediment a po delším čase se mohou tvořit i prstence [18]. Z rodu *Sacharomyces* byly vyčleněny druhy, které jsou sice tomuto rodu blízké, ale některými vlastnostmi, tj. vegetativní fází nebo nepřítomností hexosové represe dýchání, takže sporulují na ztužených půdách i v přítomnosti zkvasitelných sacharidů, se od tohoto rodu odlišují. Tyto druhy byly zařazeny do rodu *Zygosacharomyces*. Zástupci tohoto rodu většinou dobře rostou i v půdách obsahujících 50 % glukosu, takže bývají příčinou kažení medu nebo čokoládových bonbonů či figurek. Patří zde *Zygosacharomyces rouxii* nebo *Zygosacharomyces bailli*, které rostou velmi dobře i v prostředí obsahujícím 60 % glukosu a *Zygosacharomyces bailli* navíc dobře snáší i poměrně vysoké koncentrace ethanolu a SO_2 a je odolná i vůči dalším konzervačním prostředkům. Rod *Kluyveromyces* se od rodu *Saccharomyces* odlišuje hlavně tím, že nemá hexosovou represi dýchání. Patří zde *Kluyveromyces marxianus*, který zkvašuje laktosu a je součástí tzv. keřirových zrn, tj. konglomerátu kvasinek a bakterií používaného na výrobu keřiru [6] a *Kluyveromyces Lactis*, který je rovněž součástí keřirových zrn a používá se při výrobě sýrů s plísní uvnitř [14]. Rod *Pichia* patří mezi rody s nízkými kvasnými schopnostmi, protože jeho druhy zkvašují buď jenom glukózu nebo nezkvašují žádný cukr. Zástupci tohoto rodu se vyskytují jako kontaminace piva a vína, většinou ve špatně uzavřených lahvích. Podobných rodem je také rod *Hansenula*, jenž se od rodu *Pichia* liší hlavně schopností využívat dusičnany jako zdroj dusíku, kdežto *Pichia* dusičnany nevyužívá. Dalším rodem je rod *Yarrowia*. Jeho jediným druhem je *Yarrowia lipolytica*. Tato kvasinka byla úspěšně použita pro produkci biomasy z n-alkanů ropy pro krmivářské účely a také pro biotechnologické čištění ropy [6]. Vytváří pučící buňky o rozměrech $4 - 18 \cdot 3 - 6 \mu\text{m}$

a bílé nebo krémové matné kolonie [10]. Rod *Debaryomyces* má velmi slabé kvasné schopnosti a některé druhy dokonce cukry nezkrvašují vůbec. Dalšími rody této skupiny jsou rody *Lipomyces*, *Nematospora* a *Metschnikowia* [6].

Další skupinou jsou kvasinky rozmnožující se vegetativně bipolárním pučením na široké základně. Do této skupiny patří rod *Saccharomyces* se silnými kvasnými schopnostmi, dále rod *Nadsonia* jehož optimální teplota růstu je 18 až 20 °C. Při teplotě 30 °C se už nerozmnožuje. Posledním rodem této skupiny je rod *Wickerhamia* [6].

Jediným rod skupiny kvasinek, které se rozmnožují vegetativně dělením, je rod *Schizosaccharomyces*. Tento rod se vyznačuje obdélníkovitými buňkami, dobrými kvasnými schopnostmi a také nepřítomností hexosové represe dýchání. Druh *Schizosaccharomyces pombe* slouží jako modelový organismus pro genetické práce. Dále je používán v Africe pro přípravu alkoholického nápoje z prosa zvaného „pombe“ a v neposlední řadě je využíván ve vinařství, kde slouží k odkyselení vín [6]. Vytváří kulovité, elipsoidní nebo válečkovité buňky o rozměrech 3 – 5 · 5 – 15 µm. Kolonie jsou krémové až světle hnědé, hladké nebo slabě zvrásněné [19].

Další skupinu tvoří kvasinky, které představují určitý přechod mezi kvasinkami a plísněmi. Mají převážně aerobní metabolismus a velmi slabé kvasné schopnosti, některé druhy nekvasí vůbec. Patří sem například rod *Endomycopsis*, rod *Eremothecium* nebo rod *Ashbya*. Některé kmeny těchto rodů exkretují ze svých buněk značné množství vitamínu B₂ a díky tomu je možné je použít pro kvasnou přípravu tohoto vitamínu [6].

2. Rody tvořící bazidiospory nebo sporidie

Do skupiny bazidiomycetních kvasinek jsou zařazovány kvasinky, které tvoří bazidiospory (čeleď *Filobasidiaceae*), dále kvasinky tvořící tmavé telispory z nichž pučí promycelium nesoucí sporidie a také zde patří kvasinkovitá stádia některých vyšších bazidiomycet [6].

První skupinou je čeleď *Filobasidiaceae* tvořící bazidiospory. Zde patří rod *Filobasidium*, který je perfektním stádiem rodu *Cryptococcus*. Dále je zde řazen patogenní rod *Filobasidiella*, který obsahuje dva druhy kvasinek. Prvním druhem je *Filobasidiella neoformans* tvořící kulovité bazidiospory a druhým druhem je kvasinka *Filobasidiella bacillispora* s tyčinkovitými bazidiosporami. Tyto kvasinky se vyskytují

obvykle ve starém ptačím trusu, odkud se dostávají do vzduchu. Infekční cesta je vdechováním. Napadají různé tkáně zvířat i lidí a způsobují různá onemocnění, která často končí i smrtí [6].

Mezi kvasinky tvořící sporidie patří rod *Rhodosporidium* a rod *Sporidiobolus*. Rod *Rhodosporidium* je perfektním stádiem rodu *Rhodotorula* a rod *Sporidiobolus* je perfektním stádiem rodu *Sporobolomyces*. Oba tyto rody nemají žádné kvasné schopnosti a velmi často se vyskytují ve vzduchu, ale také v sladké a slané povrchové vodě, kde tvoří zhruba 50 % kvasinkové populace [6].

Další skupinu tvoří kvasinkovitá stádia vyšších bazidiomycet. Zde bývají zařazována kvasinkovitá stádia řádu *Tremellales*. Ty se obvykle vyskytují na kmenech a pařezech listnatých stromů [6].

3. Rody u nichž není známa tvorba pohlavních spor

Tyto rody jsou někdy nazývány nepravými kvasinkami nebo kvasinkovitými mikroorganismy. Nejrozsáhlejším rodem této skupiny je rod *Candida*, který obsahuje na 160 druhů. Patří zde kvasinky se silnými kvasnými schopnostmi, ale i nekvasící druhy. Některé druhy se používají k přípravě krmného droždí. K tomuto účelu slouží nejčastěji druh *Candida utilis*. *Candida boidinii* využívá metanol jako zdroj uhlíku a energie a byla navržena pro výrobu krmného droždí. *Candida kefyr* využívá laktosu. Ovšem do této skupiny patří také nebezpečné patogenní druhy. Druh *Candida albicans* může způsobovat onemocnění (kandidózy) kůže a nehtů. Může napadat také vnitřní orgány a vést ke smrti [6]. *Candida tropicalis* se také řadí mezi patogenní kvasinky. Nejčastěji se vyskytuje v ústech, v trávicím ústrojí, v plicích nebo na pokožce lidí a zvířat. Snáší teplotu až 42 °C [20]. Nepatogenní druhy se vyskytují jako kontaminanty pekařského droždí. Dalším rodem této skupiny je rod *Brettanomyces* jehož zástupci se vyskytují jako kontaminace kvašených nápojů. Rod *Kloeckera* snáší velmi kyselé prostředí, a proto ji můžeme často najít na nezralých hroznech a v půdě vinic. Morfologicky podobný je rod *Malassezia*, který může být za určitých podmínek patogenní pro zvířata i člověka. Je také běžným kontaminantem kůže zdravých lidí. Zástupci rodu *Cryptococcus* nemají kvasné schopnosti a kolonie některých druhů jsou zbarveny žlutě v důsledku tvorby karotenoidních barviv. Rod *Rhodotorula* také nezkvašuje žádné cukry a obsahuje

karotenoidní barviva, která barví jeho kolonie oranžově až růžově. Některé kmeny jsou schopny štěpit deriváty benzenu. Také rod *Sporobolomyces* nemá žádné kvasné schopnosti a tvoří žluté až sytě růžové kolonie. Vyskytuje se na listech stromů a na jiných rostlinách, odkud se dostává do stojatých i tekoucích vod. Rod *Trichosporon* obsahuje 15 druhů a některé z nich mohou být za určitých podmínek pro člověka patogenní. Některé druhy mohou štěpit deriváty benzenu. Posledním rodem této skupiny kvasinek je rod *Geotrichum*. Tvoří přechod mezi kvasinkami a plísněmi, nemá kvasné schopnosti a vyskytuje se jako kontaminace mléčných výrobků, hlavně jogurtů, tvarohu nebo i kysaného zelí [6]. Můžeme ho najít také v půdě, ve vodě, v aktivovaných kalech z odpadních vod nebo v odpadu po zpracování mořských ryb. Je to kvasinka vhodná na využití odpadních produktů ze zpracování tučných mléčných výrobků nebo tučných ryb a na neutralizaci par z rafinace olejů [11].

4. Využití kvasinek v environmentálních biotechnologiích

4.1 Průmyslově významné kvasinky

Kvasinky jsou pro člověka v mnoha směrech velmi užitečné. V průmyslu jsou důležité dvě skupiny kvasinek. První skupinu tvoří kvasinky skutečně v průmyslu využívané. Druhou skupinou jsou kvasinky se zajímavými enzymovými aktivitami, které mohou sloužit pro zlepšování vlastností stávajících kmenů [2].

4.1.1 Pivovarnictví

Při procesech při výrobě piva je jednou z nejpoužívanějších kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Dále *Saccharomyces carlsbergensis* či *Bretanomyces bruxellensis*.

Při posuzování kvasinkových kmenů vhodných pro výrobu piva se vychází z jejich morfologických, fyziologických a biochemických vlastností. Určuje se velikost buněk, jejich tvar a jeho vyrovnanost a dále je u kvasinek vyžadována stabilita jejich technologických vlastností.

Z hlediska technologie výroby je rozhodující schopnost kvasinkových kmenů zkvašovat mladinu, rozmnožování buněk, flokulace a sedimentace. Při podrobnějším posuzování kmenů se ověřuje míra zkvašování rafinózy, tolerance k ethanolu a tendence k tvorbě pseudomycelia [21].

4.1.2 Vinařství

Při výrobě vína se nejčastěji používá kvasinka *Saccharomyces vini*, která je díky svým vlastnostem také nazývána jako „vinná kvasinka“.

Dříve se při výrobě vína využívalo spontánní kvašení způsobené kvasinkami na povrchu hroznů. Dnes se používá řízené kvašení.

U vinařských kmenů je vyžadována vyšší tolerance k ethanolu než u pivovarských kmenů. Dále je požadována odolnost i vůči oxidu siřičitému, kterým se ošetřuje vinný mošt. U kmenů používaných pro výrobu šampaňských vín je nutná odolnost k 8 – 12 % ethanolu od počátku kvašení. U kvasinek používaných na výrobu tokajských vín se požaduje také odolnost ke zvýšenému osmotickému tlaku [2].

4.1.3 Lihovarnictví

Hlavním organismem v procesu lihového kvašení je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Tento druh kvasinky se vyznačuje vysokou rychlostí tvorby ethanolu, vysokou tolerancí k ethanolu a také nízkou produkcí vedlejších metabolitů [22].

4.1.4 Pekařství

Při výrobě pekařského droždí je nejpoužívanější kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*.

Cílem tohoto procesu je získání co možná největšího množství biomasy, a proto se po kvasinkách požaduje rychlé množení a co nejmenší alkoholové kvašení, protože zdroj uhlíku a energie má být maximálně využit k tvorbě biomasy [23].

4.1.5 Výroba mléčných výrobků

Kvasinky se rovněž uplatňují v procesu výroby mléčných výrobků. *Candida kefyr* se používá při výrobě kefiru a *Kluyveromyces lactis* je využívána při výrobě sýrů s plísni uvnitř [2].

4.1.6 Produkce biomasy

Výroba biomasy byla dříve prosazována pouze v zemích, které neprodukovaly jiné než rostlinné zdroje bílkovin.

Buňka kvasinek obsahuje 40 – 60 % bílkovin. Vyrobená biomasa je tedy hlavně zdrojem bílkovin, ale i vitamínů skupiny B, fosfolipidů a volných aminokyselin. Takto vyrobené kvasinky lze použít pro krmné účely ale i jako doplněk výživy člověka. Je třeba věnovat větší pozornost sterilizaci média, jeho složení a testování produkčních mikroorganismů.

Pro produkci biomasy se také dají použít kvasinky izolované z odpadních vod. Jedná se zejména o odpadní vody z průmyslových podniků (papírenských závodů, závodů na pracování oliv aj. Tyto odpadní vody jsou zdrojem cenných bílkovinných doplňků živočišné potravy. Jsou využívány především rody *Saccharomyces* a *Candida*. Hlavním cílem tohoto procesu je využití odpadů a kvalitnější čištění odpadních vod. Z odpadních vod můžeme izolovat například druh *Candida langerovii*, která je alternativou za *Candidu utilis*. Dalšími možnými izoláty jsou *Candida halophila* či *Rhodotorula glutinis* [24].

4.1.7 Produkce vitamínů

Z organických sloučenin vyskytujících se v nízkých koncentracích mají význam především vitamíny. Jejich množství kolísá v závislosti na schopnosti jednotlivých druhů je syntetizovat. Z vitamínů rozpustných ve vodě jsou zastoupeny především vitamíny skupiny B, thiamin 16 – 360 µg na gram sušiny a riboflavin 4 – 80 µg na gram sušiny. Z vitamínů rozpustných v tucích jde o provitamin D a také provitamin A. Z kvasinek využívaných pro tyto účely se jedná především o rody *Saccharomyces*, *Rhodotorula* či *Rhodospiridium* [9].

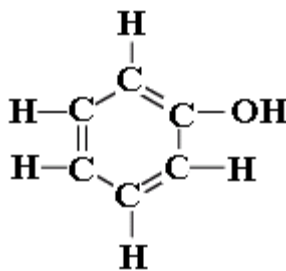
4.2 Biodegradace fenolů

Stále se zvyšující intenzita a rozsah zemědělské a průmyslové činnosti má za následek kontaminaci životního prostředí, vod, půd a vzduchu chemickými látkami. Proto je vyvíjena a aplikována celá řada sanačních technologií, aby se zmenšila a odstranila rizika spojená s působením toxických látek na přírodní ekosystémy [25].

Biodegradace představuje významnou metodu dekontaminace, při které jsou složité, ekologicky závadné látky rozkládány působením živých mikroorganismů na látky jednodušší a nezávadné. Nabízí oproti tradičním fyzikálně chemickým metodám nízké náklady a také možnost úplné mineralizace mnohým toxickým sloučenin [25, 26].

V oblasti chemie se můžeme setkat se čtyřmi miliony známých a identifikovaných sloučenin a s celou řadou ještě neznámých látek. V odpadní vodě se vyskytuje přes dva tisíce chemických kontaminantů a přibližně 750 z nich bylo dokonce identifikováno ve vodě pitné. A právě mezi těmito kontaminanty se nachází i fenol a jeho sloučeniny [27].

Fenolické látky se do životního prostředí dostávají z různých zdrojů. Přispívají k tomu procesy petrochemického průmyslu, z koksáren či plynáren. Fenol je dále využíván k výrobě fenolformaldehydových pryskyřic, mnohých barviv, výbušnin, hnojiv, léčiv apod. Odpadní látky ze všech těchto výrob velmi zatěžují životní prostředí a díky své vysoké rozpustnosti ve vodě způsobuje fenol již v nízkých koncentracích nežádoucí chuť a zápach pitné vody. Na všechny buňky, člověka nevyjímaje, působí fenol toxicky jako protoplazmatický jed a je tudíž důvodem rostoucího zájmu o jeho odstraňování z prostředí pomocí biodegradačních metod. [27].



Obrázek č. 7: Fenol [28]

4.2.1 Studium fyziologických aspektů biodegradací

Studie se zabývá rozšířením současných znalostí některých dílčích aspektů biodegradačních technologií se zaměřením na biochemickou a biologickou stránku dané problematiky, jelikož jsou tyto aspekty nezbytným předpokladem úspěšného nasazení mikroorganismů jako degradérů škodlivin [25].

Jako modelová skupina polutantů byla vybrána skupina aromatických látek na bázi fenolu díky jejich vysoké toxicitě a značné rozšířenosti. Zdrojem těchto látek je petrochemický průmysl, farmaceutický průmysl, dřevozpracující a kožedělný průmysl, havarijní úniky ropných látek či samotná výroba fenolu aj.

Pro studium těchto fyziologických aspektů biodegradací byla vybrána kvasinka *Candida maltosa* díky své schopnosti zpracovávat fenol a některé jeho deriváty jako jediné zdroje uhlíku a energie.

Byly vybrány vhodné kultivační podmínky, screeningové metody a měřicí metodiky. Byly provedeny biodegradační testy s různou škálou polutantů a byly stanoveny vybrané enzymové aktivity figurující v biodegradační dráze vybraných látek. Dosažené výsledky se mohou dále uplatnit v dalším studiu biodegradačního potenciálu dané kvasinkové populace a především v reálném biodegradačním procesu [25].

4.2.2 Oxidace fenolu pomocí *Candida tropicalis*

Při pokusech byly použity buňky eukaryotní populace *Candida tropicalis* schopné utilizovat fenol. Pokusy probíhali v laboratorním fermentoru v objemu 1,5 l při teplotě 30 °C a hodnotě pH 5,2. V průběhu pokusů byly do fermentoru zavedeny vstupy pro dávkování fenolu a hydroxidu sodného. Hodnoty teploty, pH, koncentrace

rozpuštěného kyslíku a spotřeby roztoku fenolu a hydroxidu sodného byly zaznamenávány průběžně a ukládány v časovém intervalu jedné minuty [27].

Cílem práce bylo pozorovat katabolickou aktivitu kvasinkové populace při aerobní degradaci fenolu. Z naměřených dat vyplynulo, že při přebytku všech živin v médiu je populace schopna degradovat fenol podstatně delší dobu, přibližně 50 hodin. Při limitaci živin je *Candida tropicalis* schopná degradovat fenol zhruba 26 hodin. Zjištěná data lze použít i k návrhu zařízení pro čištění odpadní fenolové vody [27].

4.2.3 Enzymy kvasinky *Candida tropicalis* podílející se na biodegradaci fenolu

Kvasinky *Candida tropicalis* (obrázek č. 8) byly kultivovány za přítomnosti fenolu, glukózy či obou těchto látek ve třech různých médiích. Po dezintegraci buněk kapalným dusíkem byly frakční centrifugací izolovány mikrosomy a cytosol [29].

Cytosol je koncentrovaný koloidní roztok makromolekul a nízko molekulárních látek tvoří tekutý obsah buňky, jehož součástí však nejsou buněčné organely [30]. Mikrosomy jsou buněčné organely, které vznikají uměle jako váčky z endoplazmatického retikula při homogenizaci tkáně a obsahují systémy cytochromu P450 [31].



Obrázek č. 8: *Candida tropicalis* [32]

Byla sledována aktivita enzymů schopných oxidovat fenol v obou buněčných frakcích. Cytosol byl dále frakcionován síranem amonným, který byl za stálého míchání přidáván po malých dávkách odpovídajících 20%, 40%, 60% a 80% nasycení roztoku.

Ze všech frakcí byl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ odstraněn dialýzou a v těchto frakcích byla sledována fenolhydroxylázová aktivita [29].

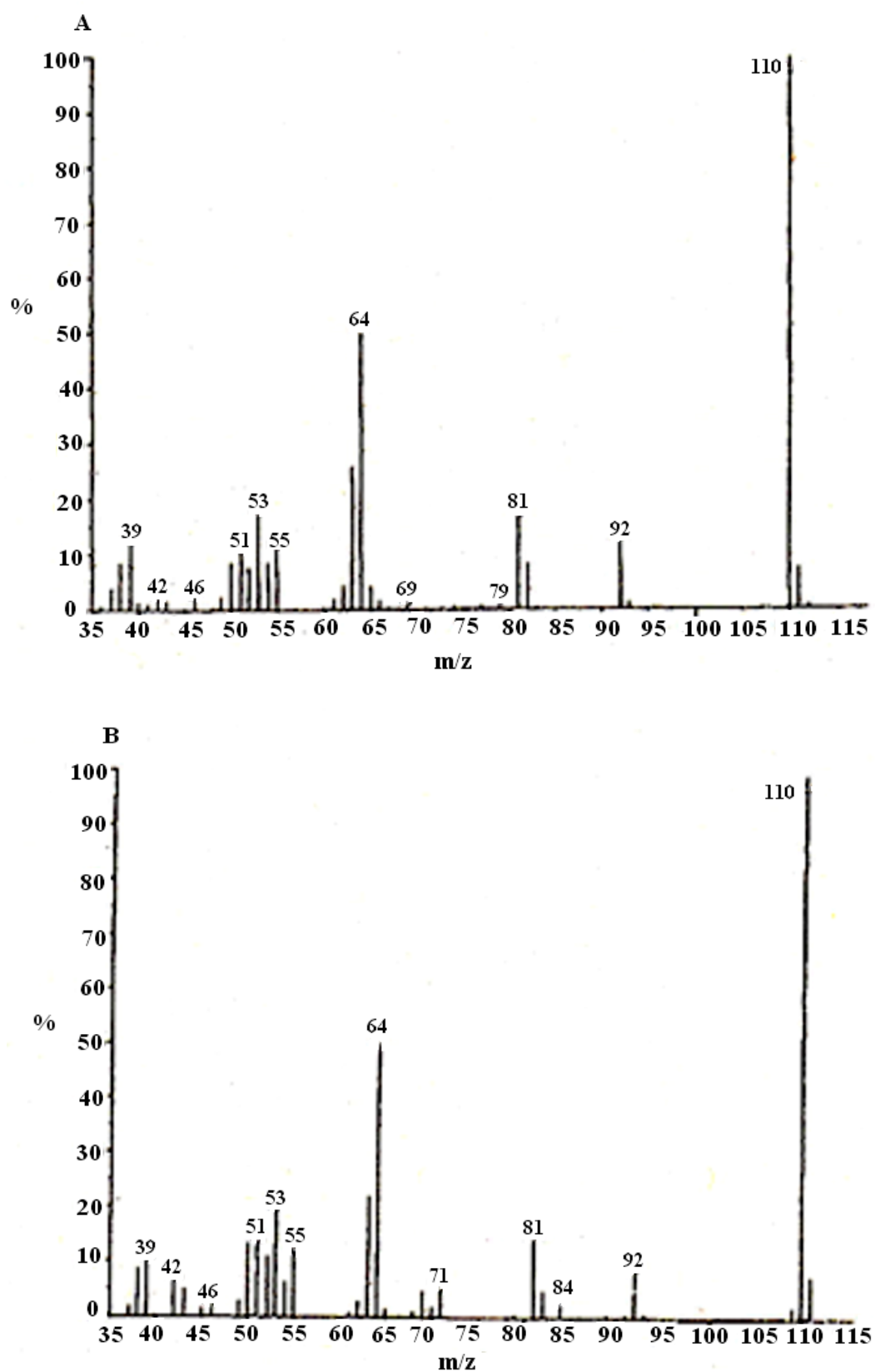
V mikrosomální frakci byla měřena koncentrace cytochromu P450 a fenolhydroxylázová aktivita. Stanovení koncentrace cytochromu P450 se provádělo měřením diferenčních spekter redukovaného cytochromu P450 s oxidem uhelnatým při vlnové délce 450 nm, poněvadž samotný redukovaný cytochrom P450 záření v této vlnové délce neabsorbuje [29].

Pro stanovení množství úbytku fenolu a přírůstku produktu (katecholu) bylo použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Množství se stanovovalo v mikrosomální frakci i ve frakci cytosolární. Takto byly kvantifikovány aktivity enzymů, které jsou zodpovědné za hydroxylaci fenolu na katechol. Separace produktů probíhala na koloně Nucleosil 100-5C18. K detekci při vlnové délce 275 nm byl použit UV-VIS detektor LCD 2563. Dále byl použit 40% roztok methanolu v redestilované vodě jako mobilní fáze, kolona byla temperována na 35 °C, vzorky byly aplikovány do objemu 20 μl a rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min. Inkubace probíhala v objemu 100 μl v otevřených mikrozkušnicích na třepačce při teplotě 37 °C [29].

Pro identifikaci metabolitu fenolu se použila hmotnostní spektrometrie. Nosným plynem bylo helium vháněné pod tlakem 68,95 kPa a byla použita kapilární kolona DB 5.

Z výsledků vyplývá, že v mikrosomech buněk využívajících glukózu a fenol či pouze fenol byl obsah cytochromu P450 detekován, zatímco v mikrosomech izolovaných z buněk využívajících pouze glukózu tento enzym nebyl detekován.

Fenol byl rovněž hydroxylován na katechol vlivem enzymů přítomných v cytosolu *Candida tropicalis*. Tento metabolit byl zjištěn pomocí HPLC. Produkt oxidace fenolu vykazoval stejné chromatografické vlastnosti jako katechol. V čase 12,5 min došlo k uvolňování fenolu a v čase 7,8 min u uvolňování katecholu. Tento metabolit fenolu byl charakterizován hmotnostní spektrometrií a identická hmotnostní spektra tohoto produktu a katecholu dokazují, že se opravdu jedná o katechol (viz obrázek č. 9) [29].



Obrázek č. 9: Hmotnostní spektra katecholu (A) a metabolitu fenolu tvořeného mikrosomy a cytosolem
Candida tropicalis [29]

4.2.4 Působení vnějších vlivů na biodegradační a enzymovou aktivitu kvasinky *Candida maltosa* vůči fenolickým aromátům

Kvasinka *Candida maltosa* (obrázek č. 10) byla izolována z prostředí dlouhodobě kontaminovaného ropnými uhlovodíky a je tudíž adaptována na vyšší koncentrace fenolu. U tohoto testu byl sledován průběh biodegradace fenolu, p-kresolu a dalších polutantů, které jsou pro kvasinku *Candida maltosa* jediným zdrojem uhlíku a energie [33].



Obrázek č. 10: *Candida maltosa* [34]

Kvasinka vykazuje toleranci ke kyselému pH. Od pH 3 do pH 7 se nemění charakter růstu a využití fenolu. Pro všechny experimenty bylo použito minimální médium YNB s jediným zdrojem uhlíku a energie fenolem nebo jiným polutantem. A byla zvolena teplota 26 °C [33].

Kvasinka byla schopná využívat fenol až do koncentrace 1,5 g/l. Byla schopná růstu po krátké lag-fázi, kdy se syntetizuje fenolem indukovaná fenolhydroxyláza (FH). Tato oxidoreduktáza dosahuje maximálních hodnot na počátku exponenciální fáze růstu kvasinky a postupně klesá její aktivita až po vymizení fenolu z média. *Candida maltosa* byla kromě fenolu schopná využívat i katechol, resorcinol, hydrochinon, dinitrofenol a prokazovala toleranci k nízkým koncentracím benzoátu a salicylátu (viz tabulka č. 2). Kvasinkou nebyl využíván pouze p-kresol jako jediný zdroj uhlíku a energie. [33].

Tabulka č. 2: Limitní koncentrace fenolických zdrojů uhlíku a energie pro kvasinku *Candida maltosa* [33]

Polutant	Maximální snesitelná koncentrace [g/l]
Fenol	1,7
Katechol	1,8
Resorcinol	2,0
Hydrochinon	0,7
Dinitrofenol	0,1
Benzoát	0,05
Salicylát	0,05

Dosažené výsledky byly potvrzeny různými měřeními a mohou být uplatněny při využívání testovaného mikroorganismu a při použití metod v reálném dekontaminačním procesu, poněvadž odstraňování polutantů biologickou cestou je šetrnější a efektivnější [33].

4.3 Biodegradace chlorfenolů

Chlorfenoly jsou krystalické látky s bodem varu nad 200 °C. V prostředí jsou daleko stabilnější než nesubstituovaný fenol. Jsou to látky nehořlavé, charakteristické svým štiplavým zápachem. Při vyšších teplotách se rozkládají na CO, CO₂ a HCl. Silně dráždí sliznice a oči, mohou se vstřebávat kůží, jejich toxicita narůstá s rostoucím stupněm chlorace a mají fytotoxické účinky [35].

Vyskytují se jako důležité meziprodukty herbicidu, 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2,4,5-trichlorfenoxyoctové kyseliny. Jsou také produkty chlorace pitné vody, která obsahuje huminové látky. Vznikají při hoření organického materiálu v přítomnosti chloru (např. při spalování městských pevných odpadů či při hoření čerstvého dřeva). Tvoří se také při chemickém bělení chlorem. Nejsou to jen látky antropogenního původu, 2,6-dichlorfenol je feromonem klíšťat [35].

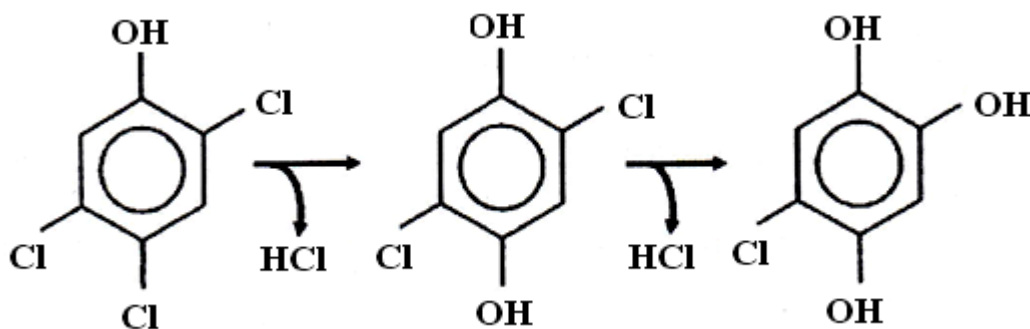
Používají se k ochraně čerstvě pokáceného dřeva proti houbám či jako biocidní přípravky přidávané do olejů a barev [35]. Dále jsou využívány v papírenském a textilním průmyslu, používají se k výrobě formaldehydových pryskyřic či při výrobě plastických hmot [36].

Mezi kvasinky aerobně biodegradující chlorfenoly patří druhy *Rhodotorula rubra*, *Candida maltosa* a *Cryptococcus elinovii*.

Biodegradaci ovlivňuje řada faktorů:

- teplota (optimální teplota je 25 – 35 °C),
- přítomnost kyslíku,
- optimální pH,
- dostatek základních živin,
- poločas degradace (pohybuje se mezi 10 až 120 dny a závisí na typu sloučeniny a na podmínkách, za kterých se nachází v půdě),
- rozpustnost ve vodě,
- adsorpční koeficient (zvyšuje se s rostoucím pH).

Monochlorfenoly a dichlorfenoly jsou nejčastěji degradovány aerobně hydroxylací na chlorkatecholy. Trichlorfenoly a polychlorfenoly jsou degradovány taktéž aerobně na para-hydrochinony. Obecně lze všechny chlorfenoly degradovat také za anaerobních podmínek. Degradace je potom iniciována reduktivní dechlorací (viz obrázek č. 11), za kterou následuje štěpení aromatického kruhu. Pokud se zvýší počet chlorových substituentů, sníží se rychlost aerobní degradace a opačně je snazší anaerobní degradace chlorfenolů [35].



Obrázek č. 11: Dechlorace chlorfenolů [35]

Úplná destrukce v půdě byla za aerobních podmínek zjištěna za 2 dny u fenolu, za 14 dní u 2-chlorfenolu, za 9 dní u 4-chlorfenolu a více než 72 dní u pentachlorfenolu [35].

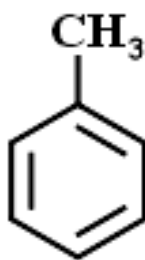
4.4 Biosorpce chromu z vodného roztoku a galvanických odpadních vod pomocí kvasinky *Candida lipolytica* a odvodněného čistírenského kalu

Cílem této studie bylo odstranění chromu (Cr) z vodných roztoků a zároveň odstranění Cr, Cu, Ni a Zn z galvanických odpadních vod pomocí kvasinky *Candida lipolytica* [37].

Důležitým parametrem pro biosorpci chromu a dalších prvků bylo počáteční pH. Optimální pH směsi se pohybovalo v rozmezí 1 – 5, pH kvasinky *Candida lipolytica* bylo 1 – 4 a pH odpadní vody bylo 2 – 4. Dalšími důležitými parametry bylo dávkování biosorbentu a doba kontaktu mezi kvasinkou a prvky [37].

4.5 Odstranění toluenu pomocí granulovaného aktivního uhlí a kvasinky *Candida tropicalis* v bioreaktoru

Kvasinka *Candida tropicalis* byla úspěšně použita pro biodegradaci plynného toluenu v bioreaktoru. Účinnost odstranění toluenu byla tím vyšší, čím nižší byl průtok plynu v bioreaktoru a dále při použití aktivního uhlí. Při použití GAC fluidního reaktoru se účinnost odstranění toluenu pohybovala v rozmezí 50 až 82 %. Maximální odstranění toluenu ve fluidním reaktoru bylo 172 g/m³/h [38].



Obrázek č.12: Toluen [39]

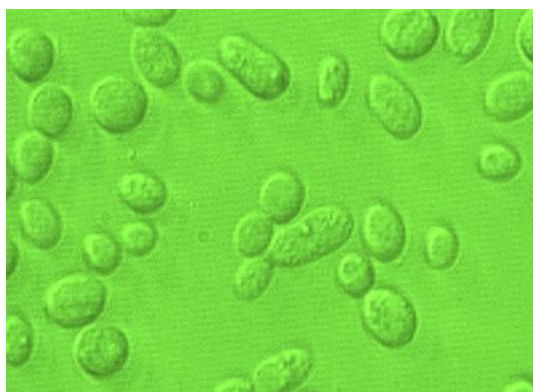
4.6 Kvasinky jako bioflokulanty při úpravách černouhelných kalů

Cílem této studie bylo ověřit, zda je možné použít kvasinky jako bioflokulanty při praktickém využití selektivní flotace, flotoflotace a bioflotoflotace. Jako bioflokulanty byly použity kvasinky *Rhotorula glutinis* a *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen.

Bylo použito uhlí Dolu František, černouhelný kal z odkališť Dolu Dukla a černouhelný kal z odkališť Dolu Lazy [40].

4.6.1 Kultivace *Rhodotorula glutinis*

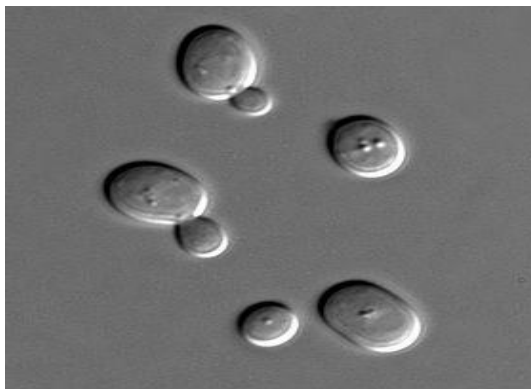
Kultivace této kvasinky probíhala na sladovém agaru nebo sladovém extraktu při teplotě 17 – 25 °C. V prvních třech až čtyřech dnech byly její kultury růžové až světle červené a jejich okraj kruhovitý a nevláknitý. Buňky o velikosti 3 – 5 · 5 – 9 µm byly oválné. Od sedmého dne získávali kultury bledorůžovou barvu, byly zvrásněné a korálově červené či lehce oranžové a buňky zůstali přibližně stejně velké [40].



Obrázek č. 13: *Rhodotorula glutinis* [41]

4.6.2 Kultivace *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen

Zde probíhala kultivace na sladovém extraktu s obsahem 11 – 12 % zkvasitelných cukrů při teplotě 5 – 10 °C a pH 4,2 – 5,6. Při kvašení bylo třeba zajistit aerobní podmínky [40].



Obrázek č. 14: *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen [42]

4.6.3 Selektivní flokulace

Selektivní flokulace je procesem založeným na flokulaci jedné ze složek nehomogenní suspenze v době, kdy ostatní složky zůstávají v dispergovaném stavu [40]. Flokulace je pochod, při němž se malé částice shlukují do větších útvarů a vznikají shluky volně vázaných částic [43]. Selektivní flokulace spočívá v tom, že se do nehomogenní suspenze přidává flokulační činidlo, které působí selektivně a způsobuje shlukování jedné ze složek suspenze do vloček. Vzniklé vločky se od ostatních částic oddělují sedimentací [40].

Testy selektivní flokulace byly prováděny na vzorcích z úpravny uhlí Dolu František a byly použity oba druhy kvasinek. Jelikož z výsledků vyplynulo, že použití selektivní flokulace nepřineslo žádané výsledky, budu se zabývat dalšími použitými metodami.

4.6.4 Flotoflokulace a bioflotoflokulace

Princip flotoflokulace spočívá v tom, že se po přidání dispergátorů do flotačního prostředí přidává ještě selektivně působící flokulační činidlo. Toto činidlo způsobí shlukování užitkové složky do vloček, které se po přidání flotačních reagentů oddělují sedimentací od zbytku směsi [40].

Při flotoflokulaci s bioflokulanty byla aplikována čistá kultura kvasinky *Rhodotorula glutinis*, odpadní pivovarské kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, které byly získány v Pivovaru Zlatovar, a.s. Opava, a čistá kultura pivních kvasinek *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen získána v Pivovaru Ostravar, a.s. Ostrava.

Do flotačního prostředí, které bylo zahuštěno na 150 g/l, byl nejprve dávkován bioflokulant. Jeho promíchávání se rmutem trvalo 1 minutu. Poté byl dávkován flotační sběrač Montanol nebo Flotakol NX a promíchávání se rmutem trvalo opět 1 minutu. Následovala samotná flotace, jejíž základní čas byl 5 minut. Následně byly produkty flotace (koncentrát, odpady) zfiltrvány, vysušeny a podrobeny chemické analýze [40].

Bioflotoflokulační testy černouhelných kalů z odkališť Dolu František

Při těchto experimentech byly použity vzorky z kalové nádrže B1, D6 a D8. Optimální dávka bioflokulantu byla 10 ml. Z výsledků vyplynulo, že se podařilo dosáhnout požadované kvality flotačních koncentrátů. Nejlépe se jevila aplikace kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen z Pivovaru Ostravar, a.s. Ostrava,

protože se dosáhlo nejvyšších hmotnostních výnosů o cca 15 % při zachování požadované kvality koncentrátů pod 10 % popela [40].

Bioflotoflokulační testy černouhelných kalů z odkališť Dolu Dukla

Při tomto testu byl do flotačního rmutu se zahuštěním 150 g/l nejprve dávkován bioflokulant a promíchání se rmutem trvalo 1 minutu. Poté byl nadávkován flotační sběrač Montanol (200 g/t) nebo Flotakol (300 g/t). Následovala opět minutová agitace se rmutem a poté vlastní flotoflokulace, která trvala 5 minut.

Jako bioflokulant byly použity kvasinky *Rhodotorula glutinis* a *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen z Pivovaru Ostravar, a.s. Ostrava. Použity byly kaly z malé kalové nádrže č. 2.

Z výsledků vyplynulo, že optimální dávka bioflokulantu byla opět 10 ml. Při aplikaci sběrače Montanol se jevil jako vhodný bioflokulant *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, protože u všech vzorků došlo k výraznému zvýšení výnosu flotačního koncentráту při zachování kvality. Použití *Rhodotoruly glutinis* nemělo žádné výsledky. Při aplikaci sběrače Flotakolu NX byly výsledky podobné, ale k výraznému zlepšení došlo při aplikaci *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, kde se zvýšil flotační koncentrát o více než 30 % [40].

Bioflotoflokulační testy černouhelných kalů z odkališť Dolu Lazy

Zde byly použity vzorky z kalové nádrže B1, D6 a D8, jako bioflokulanty kvasinky *Rhodotorula glutinis* a *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen a dávka sběračů Montanol a Flotakol NX byla 200 g/t.

Z výsledků vyplynulo, že jako optimální dávka bioflokulantu se jevílo opět množství 10 ml. U obou sběračů se podařilo dosáhnout požadované kvality flotačních koncentrátů. A jako nejlepší se opět jevila aplikace kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen [40].

5. Závěrečné shrnutí

Kvasinky jsou jednobuněčné heterogenní eukaryotní mikroorganismy patřící mezi houby (*Fungi*) bez chlorofylu. Jejich buňky, o velikosti 3 – 5 μm , mají většinou elipsoidní tvar a jsou složeny z pevné buněčné stěny, jemné cytoplazmatické membrány a cytoplazmy, která obsahuje buněčné organely. Kvasinky se mohou rozmnožovat pučením nebo příčným dělením. Tyto způsoby patří mezi vegetativní. Druhým způsobem je rozmnožování pohlavní, jehož výsledkem je tvorba pohlavním spor.

K nejznámějším rodům kvasinek patří rod *Saccharomyces*, který je používán především v potravinářském průmyslu. Ze zástupců je možné uvést *Saccharomyces cerevisiae* či *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen. Dalším, velmi početným rodem, je rod *Candida*, který obsahuje okolo 160 druhů kvasinek. Jeho nejznámějšími zástupci jsou například *Candida tropicalis*, *Candida maltosa* či *Candida lipolytica*. Dalšími důležitými rody jsou například rod *Rhodotorula*, rod *Pichia* nebo rod *Cryptococcus*.

Kvasinky jsou pro člověka v mnoha směrech velmi užitečné. V průmyslu jsou často využívány v pivovarnictví, vinařství, pekařství, při výrobě mléčných výrobků nebo biomasy. Ale jelikož stále vzrůstá kontaminace životního prostředí chemickými látkami a biodegradace představují velmi významnou metodu dekontaminace, je tato bakalářská práce věnována využití kvasinek v environmentálních biotechnologiích.

Práce byla zaměřena na biodegradaci fenolů pomocí kvasinek *Candida tropicalis* a *Candida maltosa*. Dále na biodegradaci chlorfenolů pomocí kvasinek *Rhodotorula rubra*, *Candida maltosa* či *Cryptococcus elinovii*. Další studie se zabývaly biosorpcí chromu z vodného prostředí pomocí kvasinky *Candida lipolytica*, odstraňováním toluenu pomocí kvasinky *Candida tropicalis* a použitím kvasinek *Rhodotorula glutinis* a *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen jako bioflokulantů při úpravě černouhelných kalů.

Z výsledků testů vyplynulo, že jsou kvasinky velmi důležitou skupinou mikroorganismů při použití biodegradačních a dekontaminačních metod a procesů a že jsou schopny pomoci člověku při odstraňování polutantů z životního prostředí šetrnější biologickou cestou.

6. Seznam použité literatury

- [1] NOVOTNÝ, Čeněk. *Biodegradace a biotechnologie*. 1. vydání. Ostrava : Ediční středisko ostravské univerzity, 2005. 96 s. ISBN 80-7368-096-3.
- [2] JANDEROVÁ, Blanka; BENDOVIÁ, Olga. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1999. 108 s. ISBN 80-7184-990-1.
- [3] FEČKO, Peter, et al. *Environmental Biotechnology*. Ostrava : Publishing services department, VŠB – Technical University of Ostrava, 2006. 182 s. ISBN 80-248-1090-5.
- [4] KOPECKÁ, Jana. *Kvasinky a jejich využití*. Brno, 2009. 36 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně.
- [5] ČECHOVÁ, Leona; JANALÍKOVÁ, Magda. *Obecná mikrobiologie*. 1. vydání. Zlín : UTB – Academie centrum, 2007. 190 s. ISBN 978-80-7318-516-9.
- [6] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vydání, opravené a doplněné. Praha : Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [7] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vydání. Bratislava : Alfa, 1982. 488 s. ISBN 63-154-82.
- [8] RŮŽIČKA, Jan. *Mikrobiologie pro technology životního prostředí*. 1. vydání. Zlín : Ediční středisko FT, 1999. 124 s. ISBN 80-214-1374-3.
- [9] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. 1. vydání. Praha : Academia, 1986. 376 s. ISBN 21-023-86.
- [10] Vscht.cz [online]. c2009 [cit. 2010-03-19]. Miniatlasy mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/yarro.htm>>.
- [11] Vscht.cz [online]. c2009 [cit. 2010-03-19]. Miniatlasy mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/geot.htm>>.
- [12] Vscht.cz [online]. c2009 [cit. 2010-03-19]. Miniatlasy mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/pich-memh.htm>>.

- [13] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-19]. Miniatlask mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/sacchmy.htm>>.
- [14] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-19]. Miniatlask mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/kluy-la.htm>>.
- [15] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-19]. Miniatlask mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/cand-util.htm>>.
- [16] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-19]. Miniatlask mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/rhod-glu.htm>>.
- [17] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-19]. Miniatlask mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/aureob.htm>>.
- [18] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-20]. Miniatlask mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/sacch.htm>>.
- [19] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-20]. Miniatlask mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/schizo.htm>>.
- [20] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-20]. Miniatlask mikroorganismů. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/cand-trop.htm>>.
- [21] *Muni.cz* [online]. c1996-2009 [cit. 2009-11-22]. Pivovarské kvasinky v moderních biotechnologiích. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pivokvas/pivokvas.html>>.
- [22] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2009-11-22]. Lihovarnictví a výroba lihovin. Dostupné z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/liho.pdf>>.
- [23] *Muni.cz* [online]. c1996-2009 [cit. 2010-02-01]. Pekařské kvasinky v moderních biotechnologiích. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/pekkvas/pekkvas.html>>.
- [24] *Muni.cz* [online]. c1996-2009 [cit. 2010-02-17]. Využití kvasinek pro produkci biomasy; produkce vitamínů kvasinkami. Dostupné z WWW: <<http://sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/vyuziti/vyuziti.html>>.
- [25] FIALOVÁ, Ariana. *Fysiologické aspekty biodegradací*. Praha, 2005. Dizertační práce. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.

- [26] MASNÍKOVÁ, Jana. *Biodegradace PAU a PCB*. Ostrava, 2009. 46 s. Bakalářská práce. Vysoká škola báňská – technická univerzita Ostrava.
- [27] KOSTEČKOVÁ, Alena. *Biodegradace VI*. 1. vydání. Semtín : Callisto-96 a.s., 2003. Porovnání katabolické aktivity eukaryotních a prokaryontních buněk oxidujících fenol, s. 117. ISBN 80-903203-2-5.
- [28] *Hyperlink.cz* [online]. c2000-2005 [cit. 2010-03-30]. Fenol. Dostupné z WWW: <<http://xantina.hyperlink.cz/spravce2/organika/fenol.gif>>.
- [29] PÁCA, Jan. *Biodegradace VI*. 1. vydání. Semtín : Callisto-96 a.s., 2003. Enzymy kvasinky *Candida tropicalis* participující na biodegradaci fenolu, s. 117. ISBN 80-903203-2-5.
- [30] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-03-30]. Milan Kodíček: Biochemické pojmy (výkladový slovník). Dostupné z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=cytosol>.
- [31] *Muni.cz* [online]. c1996-2009 [cit. 2010-03-30]. Mikrosomy. Dostupné z WWW: <http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0065.htm>.
- [32] *Ehow.com* [online]. c1999-2010 [cit. 2010-04-01]. *Candida tropicalis*. Dostupné z WWW: <<http://i.ehow.com/images/a04/u2/3c/candida-tropicalis-symptoms-800X800.jpg>>.
- [33] FIALOVÁ, Ariana. *Biodegradace VI*. 1. vydání. Semtín : Callisto-96 a.s., 2003. Působení vnějších vlivů na biodegradační a enzymovou aktivitu mikrobiálních populací vůči fenolickým aromatickým látkám, s. 117. ISBN 80-903203-2-5.
- [34] *Biotechvnu.edu.vn* [online]. c2005-2007 [cit. 2010-04-01]. *Candida maltosa*. Dostupné z WWW: <http://biotechvnu.edu.vn/vtcc/components/com_virtuemart/shop_image/product/Candida_maltosa_48732d8f0f480.jpg>.
- [35] HORÁK, Petr. *Mechanismy biodegradací kontaminantů a bioasanační techniky*. 1. vydání. Ústí nad Labem : MINO, 2006. 204 s. ISBN 80-7044-814-8.
- [36] *Piskac.cz* [online]. 28.12.2006 [cit. 2010-04-01]. Chlorfenoly. Dostupné z WWW: <<http://www.piskac.cz/pavel/recenze/TIS/CHLORFENOLY.RTF>>.

- [37] *Sciencedirect.com* [online]. c2010 [cit. 2010-03-30]. ScienceDirect - Bioresource Technology : Biosorption of chromium from aqueous solution and electroplating wastewater using mixture of *Candida lipolytica* and dewatered sewage sludge. Dostupné z WWW: <
http://80.www.sciencedirect.com/dialog/cvut.cz/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V24-4YC39MR-2&_user=822117&_coverDate=06%2F30%2F2010&_alid=1274357507&_rdoc=72&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5692&_docanchor=&view=c&_ct=265690&_acct=C000044516&_version=1&_urlVersion=0&_userid=822117&md5=e08f8ab00e503b6519d7e77e8abf4289>.
- [38] *Sciencedirect.com* [online]. c2010 [cit. 2010-03-30]. ScienceDirect - Journal of Hazardous Materials : Enhanced toluene removal using granular activated carbon and a yeast strain *Candida tropicalis* in bubble-column bioreactors. Dostupné z WWW: <
http://80.www.sciencedirect.com/dialog/cvut.cz/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TGF-4XT3HTH-5&_user=822117&_coverDate=04%2F15%2F2010&_alid=1274374245&_rdoc=10&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5253&_docanchor=&view=c&_ct=4645&_acct=C000044516&_version=1&_urlVersion=0&_userid=822117&md5=273600e9676ae2d3ab513fd36a4c2217>.
- [39] *Obrazky.cz* [online]. c1996-2010 [cit. 2010-04-01]. Toluen. Dostupné z WWW: <
<http://www.obrazky.cz/detail?id=eJyVz1FOwyAAgOF37iJQGGr0pioy%2BrWGLdo3fZiKLBChLYpDNud3gfjAXaA709%2Buc69/KwvIMIBkoGzsUGNRQIIA7zcY/Hcx4pKKmcWj91GKxdY5V6X1TWf3g772JS1bdqiANunlG6m6Yuefnasws6vFrONj%2BtdmbWcqKbeZofjxwtrTiugQxjuEYqz5JEHZX2IBkYvdIDiipTQPerHlnfmm6Mwm4vQu9vagODl17E3/HOCVQB2dBhkFCCKD/3ilpOIWDEV7xUWgoeoeMf7jl5K8pljlm2SJN2ZkRnKe/MGlu/g&sId=ED4IZ0XTwlAIFT7ETTXN&s=img>>.
- [40] FEČKO, Peter. *Netradiční způsoby úpravy černouhelných kalů*. 2. vydání. Ostrava : Ediční středisko VŠB-TUO, 2001. 149 s. ISBN 80-7078-921-2.

- [41] *Vscht.cz* [online]. c2009 [cit. 2010-04-01]. *Rhodotorula glutinis*. Dostupné z WWW: < <http://www.vscht.cz/kch/galerie/obrazky/kvasinky/rhod.gif>>.
- [42] *Wikipedia.org* [online]. 27.2.2010 [cit. 2010-04-01]. *Soubor:S cerevisiae under DIC microscopy.jpg* - Wikipedie, otevřená encyklopedie. Dostupné z WWW: < http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg>.
- [43] Přednášky Ing. Miluše Hláváté, Ph.D

7. Seznam obrázků

<i>Obrázek č. 1: Tvar buněk kvasinek.....</i>	<i>3</i>
<i>Obrázek č. 2: Struktura buňky kvasinek.....</i>	<i>4</i>
<i>Obrázek č. 3: Schéma pučení kvasinek.....</i>	<i>10</i>
<i>Obrázek č. 4: Schéma pohlavního rozmnožování kvasinek.....</i>	<i>11</i>
<i>Obrázek č. 5: Střídání haploidní a diploidní fáze u kvasinek.....</i>	<i>11</i>
<i>Obrázek č. 6: Očkovací dráty.....</i>	<i>15</i>
<i>Obrázek č. 7: Fenol.....</i>	<i>29</i>
<i>Obrázek č. 8: Candida tropicalis.....</i>	<i>30</i>
<i>Obrázek č. 9: Hmotnostní spektra katecholu a metabolitu fenolu.....</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek č. 10: Candida maltosa.....</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek č. 11: Dechlorace chlorfenolů.....</i>	<i>35</i>
<i>Obrázek č. 12: Toluén.....</i>	<i>36</i>
<i>Obrázek č. 13: Rhodotorula glutinis.....</i>	<i>37</i>
<i>Obrázek č. 14: Saccharomyces carlsbergensis Hansen.....</i>	<i>37</i>

8. Seznam tabulek

<i>Tabulka č. 1: Složení popela kvasinek.....</i>	<i>8</i>
<i>Tabulka č. 2: Limitní koncentrace fenolických zdrojů uhlíku a energie pro kvasinku Candida maltosa</i>	<i>34</i>